UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENFERMAGEM DE RIBEIRÃO PRETO

THAÍS VILELA SILVA

BIOENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS NA BACIA HIDROGRÁFICA DO
RIO PARDO (UGRHI 04), BRASIL

RIBEIRÃO PRETO

2017

THAÍS VILELA SILVA

BIOENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS NA BACIA HIDROGRÁFICA DO
RIO PARDO (UGRHI 04), BRASIL

Dissertação apresentada à Escola de Enfermagem de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Mestre em Ciências, Programa
de Pós-Graduação Enfermagem em Saúde Pública.

Linha de pesquisa: Saúde Ambiental

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Susana Inés Segura-Muñoz

RIBEIRÃO PRETO

2017

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.

Silva, Thaís Vilela

Bioensaios ecotoxicológicos na Bacia Hidrográfica do Rio Pardo (UGRHI 04), Brasil. Ribeirão Preto, 2017.

114f.: il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Enfermagem em Saúde Pública.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Susana Inés Segura-Muñoz

1. Bioensaios 2. Ecotoxicologia 3. Água superficial 4. Rio Pardo
5. *Daphnia similis* 6. *Ceriodaphnia dubia* 7. *Vibrio fischeri*

SILVA, T. V. **Bioensaios ecotoxicológicos na Bacia Hidrográfica do Rio Pardo (UGRHI 04), Brasil.** Dissertação apresentada à Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação Enfermagem em Saúde Pública.

Aprovado em: ____/____/____.

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

*Aos meus queridos pais, **Deliane e Evandro**, que, por muitas vezes abriram mão de seus sonhos em função dos meus, pelo amor incondicional compartilhado, pela confiança, pelo incentivo e por sempre estarem ao meu lado.*
Dedico este trabalho!

AGRADECIMENTOS

*Primeiramente, agradeço a **Deus**, por sempre estar no comando do meu caminho e me proporcionar esta oportunidade. Por ser o meu guia, que me protege e me ilumina.*

*A **você** leitor, pela atenção dedicada à leitura e interesse em buscar esse trabalho como fonte de informações.*

*À minha orientadora **Prof.^a Dr.^a Susana Inés Segura-Muñoz**, pela confiança em mim depositada, pela impecável orientação, pela preciosa paciência. Agradeço também pelo apoio, pela competência e pela valiosa experiência. Obrigada por tudo!*

*À minha família. Aos meus pais, **Deliane e Evandro**, e aos meus irmãos, **Lucas e Felipe**, pela cumplicidade, pelo afeto, pelas alegrias e pelos inúmeros beijos e abraços. Obrigada, meus amores!*

*Ao meu namorado **Getúlio**, pelo amor, companheirismo e carinho. Agradeço também por toda paciência e pelo cuidado que tem comigo, pelo apoio, pela força e pelo incentivo. Pelos momentos incríveis que passamos, por todos os sonhos que ainda realizaremos juntos e, acima de tudo, por me ensinar a amar e ser amada.*

*Ao **Dr. Eduardo Angelino Savazzi**, pela disponibilidade, ajuda e pelas valiosas considerações. Sem a sua colaboração, o projeto não teria sido possível! A você, o meu muito obrigada!*

*Aos parceiros **André, Fátima, Maristela e Sr. Joaquim**, pela colaboração na realização das análises feitas em laboratório.*

*Aos meus colegas do LEPA, **Beatriz, Brisa, Carol, Gabriel, Guilherme, Karina, Renato e Rudison**, que sempre me incentivaram na realização e conclusão deste trabalho. Obrigada pelos momentos de descontração, pelo companheirismo, pelos auxílios e por fazerem com que o ambiente de trabalho se tornasse agradável.*

*Àquelas as quais nem preciso citar nomes, as **minhas amigas**. Obrigada pelos inúmeros momentos juntas. A amizade, as risadas, as conversas, os desabafos, a parceria e, acima de tudo, o companheirismo.*

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

À Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, pela oportunidade!

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a concretização deste trabalho, muito obrigada!

Meus sinceros agradecimentos!

“A educação é a arma mais poderosa para mudar o mundo.”
Nelson Mandela

RESUMO

SILVA, T. V. **Bioensaios ecotoxicológicos na Bacia Hidrográfica do Rio Pardo (UGRHI 04), Brasil.** 2017. 114f. Dissertação (Mestrado) - Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

A água é um importante recurso natural que contribui para melhorias no bem-estar social e desenvolvimento inclusivo. A presença de produtos químicos, rejeitos radioativos e agentes infecciosos pode comprometer a qualidade desse recurso, afetando a biodiversidade e a subsistência de milhões de pessoas. A Ecotoxicologia Aquática é uma ciência que surgiu para dar suporte no enfrentamento dos problemas de contaminação dos corpos d'água por compostos tóxicos. Seus instrumentos de análise são capazes de avaliar a toxicidade de compostos químicos, sinalizando os potenciais efeitos ecotoxicológicos e seus mecanismos de ação em organismos vivos em ambientes impactados. A Bacia Hidrográfica do Rio Pardo (UGRHI 04) abrange 27 municípios com um importante contingente populacional (1.092.477 habitantes), inserido em uma região cuja prática agrícola baseia-se na cultura de cana-de-açúcar para a produção de etanol e açúcar. Dentro desse contexto, o objetivo do estudo foi avaliar a toxicidade para organismos bioindicadores de amostras de água superficial do Rio Pardo, principal afluente da Bacia Hidrográfica do Rio Pardo. Foram realizados ensaios de toxicidade aguda com *Daphnia similis* e *Vibrio fischeri*, e toxicidade crônica com *Ceriodaphnia dubia*. Adicionalmente, analisaram-se Oxigênio Dissolvido (OD), pH e Temperatura da água. Os resultados obtidos mostraram que, os parâmetros físico-químicos analisados estão de acordo com os limites estabelecidos pela Resolução CONAMA 357/2005 [OD (≥ 5 mgO₂/L); pH (6 a 9)]. Nos ensaios de toxicidade aguda realizados com *Daphnia similis*, tanto na estação chuvosa quanto na estação seca, não observou-se toxicidade sobre os organismos testados. Todas as amostras foram classificadas como Não Tóxicas (NT). Nos ensaios de toxicidade crônica com *Ceriodaphnia dubia*, na estação chuvosa, nenhuma das amostras analisadas apresentou toxicidade. Das amostras analisadas na estação seca, 50% apresentaram Efeito Crônico (EC); os resultados mostraram diferença estatisticamente significativa entre o número médio de neonatos produzidos por adulta no grupo controle (19,2) e nas amostras dos pontos de coleta 2 (10,7), 3 (10,5) e 5 (8,1). No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa nas amostras dos pontos de coleta 1 (13,7), 4 (12,3) e 6 (14,3), classificadas como NT. A comparação entre os resultados obtidos no presente estudo, nos ensaios de toxicidade crônica com *Ceriodaphnia dubia*, mostrou similaridade com a série histórica de dados (2010-2015) fornecida pela Agência Ambiental do Governo do Estado de São Paulo (CETESB). Nos ensaios de toxicidade aguda realizados com *Vibrio fischeri*, nas estações chuvosa e seca do ano de 2016, não observou-se toxicidade sobre a bactéria após os períodos de 5 e 15 minutos de exposição; todas as amostras foram classificadas como NT. Apesar do Rio Pardo estar inserido em área com reconhecido uso de produtos agrícolas e pouca proteção de Áreas de Preservação Permanente (APP), os resultados mostraram toxicidade apenas para o organismo *Ceriodaphnia dubia*, na estação seca do ano de 2016, possivelmente relacionada com a diminuição da vazão média e a concentração de poluentes na água. Cabe destacar a importância da manutenção do monitoramento periódico pela CETESB, considerando o Art. 14 da Resolução CONAMA 357/2005, que prevê a “não verificação de efeito tóxico crônico a organismos” para águas doces de Classe 1 e 2 no contexto brasileiro.

Palavras-chave: Bioensaios, Ecotoxicologia, Água superficial, Rio Pardo, *Daphnia similis*, *Ceriodaphnia dubia*, *Vibrio fischeri*.

ABSTRACT

SILVA, T. V. **Ecotoxicological bioassays in the Pardo River Hydrographic Basin (UGRHI 04), Brazil.** 2017. 114f. Master's Thesis - University of São Paulo at Ribeirão Preto, College of Nursing in Ribeirão Preto.

Water is an important natural resource that contributes to improvements in social well-being and inclusive development. The presence of chemicals, radioactive waste and infectious agents can compromise the quality of this resource, affecting the biodiversity and livelihoods of millions of people. Aquatic Ecotoxicology is a science that has emerged to support the problems of contamination of water bodies by toxic compounds. Its analytical instruments are able to evaluate the toxicity of chemical compounds, signaling the potential ecotoxicological effects and their mechanisms of action in living organisms in impacted environments. The Pardo River Hydrographic Basin (UGRHI 04) covers 27 municipalities with a significant population (1.092.477 inhabitants), inserted in a region whose agricultural practice is based on the cultivation of sugarcane for the production of ethanol and sugar. In this context, the objective of the study was to evaluate the toxicity to bioindicators organisms of surface water samples of the Pardo River, main tributary of the the Pardo River Hydrographic Basin. Acute toxicity tests were performed with *Daphnia similis* and *Vibrio fischeri*, and chronic toxicity with *Ceriodaphnia dubia*. In addition, dissolved oxygen (DO), pH and water temperature were analyzed. The obtained results showed that the physical-chemical parameters analyzed are in accordance with the limits established by CONAMA Resolution 357/2005 [DO (≥ 5 mgO₂ / L); pH (6 to 9)]. In the acute toxicity tests performed with *Daphnia similis*, both in rainy season and in dry season, no toxicity was observed on the organisms tested. All samples were classified as Non-Toxic (NT). In the chronic toxicity tests with *Ceriodaphnia dubia* in the rainy season none of the analyzed samples presented toxicity. Of the samples analyzed in the dry season, 50% presented Chronic Effect (CE); The results showed a statistically significant difference between the mean number of neonates produced by the adult in the control group (19,2) and the collection points 2 (10,7), 3 (10,5) and 5 (8,1). However, there was no statistically significant difference in the samples from collection points 1 (13,7), 4 (12,3) and 6 (14,3), classified as NT. The comparison between the results obtained in the present study in the chronic toxicity tests with *Ceriodaphnia dubia* showed similarity with the historical data series (2010-2015) provided by the Environmental Agency of the State of São Paulo (CETESB). In the acute toxicity tests performed with *Vibrio fischeri* in the rainy and dry seasons of 2016, no toxicity was observed on the bacteria after periods of 5 and 15 minutes of exposure; All samples were classified as NT. Although Rio Pardo is inserted in an area with recognized use of agricultural products and little protection from Permanent Preservation Areas (PPA), the results showed toxicity only for the *Ceriodaphnia dubia* organismo, in the dry season of 2016, possibly related to the decrease in average flow and the concentration of pollutants in the water. It is important to highlight the importance of Maintenance of periodic monitoring by CETESB, considering Art. 14 of CONAMA Resolution 357/2005, which provides for "non-verification of chronic toxic effect to organisms" for Class 1 and 2 fresh waters in the Brazilian context.

Keywords: Bioassays, Ecotoxicology, Surface water, Rio Pardo, *Daphnia similis*, *Ceriodaphnia dubia*, *Vibrio fischeri*.

RESUMEN

SILVA, T. V. **Bioensayos ecotoxicológicos en la cuenca do Río Pardo (UGRHI 04), Brasil.** 2017. 114f. Disertación (Maestría) - Escuela de Enfermería de Ribeirão Preto, Universidad de São Paulo, Ribeirão Preto.

El agua es un recurso natural importante que contribuye para el bienestar social y el desarrollo inclusivo de la población. La presencia de productos químicos, residuos radiactivos y agentes infecciosos puede comprometer la calidad de este recurso, afectando la biodiversidad y la sobrevivencia de millones de personas. Ecotoxicología Acuática es una ciencia que surgió para apoyar el enfrentamiento de los problemas relacionados con la contaminación por compuestos tóxicos en cuerpos de agua. Sus herramientas de análisis son capaces de evaluar la toxicidad de compuestos químicos, señalizando posibles efectos ecotoxicológicos y sus mecanismos de acción en los organismos que viven en ecosistemas impactados. La cuenca del Río Pardo (UGRHI 04) abarca 27 municipios con un importante contingente poblacional (1.092.477 habitantes), inserido en una región cuya práctica agrícola se basa en la cultura de la caña de azúcar, para la producción de etanol y azúcar. En ese contexto, el objetivo del estudio fue evaluar los bioindicadores de toxicidad de muestras de agua superficial del Río Pardo, principal afluente de la cuenca hidrográfica del Río Pardo. Ensayos de toxicidad aguda se llevaron a cabo con *Daphnia similis* y *Vibrio fischeri*, y de toxicidad crónica con *Ceriodaphnia dubia*. También se analizaron el Oxígeno Disuelto (OD), pH y temperatura del agua. Los resultados mostraron que los parámetros fisicoquímicos están de acuerdo con los límites establecidos por CONAMA 357/2005 [OD (≥ 5 mgO₂ / l); pH (6 a 9)]. En las pruebas de toxicidad aguda con *Daphnia similis*, tanto en la estación lluviosa como en la estación seca, no se observó toxicidad en los organismos testados. Todas las muestras se clasificaron como No Tóxico (NT). En las pruebas de toxicidad crónica con *Ceriodaphnia dubia*, en la estación lluviosa, ninguna de las muestras mostró toxicidad. De las muestras analizadas en la estación seca, 50% presentaron efecto crónico (EC); los resultados mostraron una diferencia estadísticamente significativa entre el número medio de los neonatos producidos por adulta en el grupo-control (19,2) y en las muestras de los puntos de colecta 2 (10,7), 3 (10,5) y 5 (8,1). Sin embargo, no hay diferencias estadísticamente significativas en las muestras de los puntos de coleta 1(13,7), 4(12,3) y 6 (14,3), clasificados como NT. Los resultados obtenidos en las pruebas de toxicidad crónica con *Ceriodaphnia dubia* presentan similitud con una serie de datos históricos (2010-2015) fornecida por la Agencia de Medio Ambiente del Gobierno del Estado de Sao Paulo (CETESB). En las pruebas de toxicidad aguda con *Vibrio fischeri*, en las estaciones lluviosa y seca del año 2016, no se observó toxicidad sobre la bacteria después de períodos de 5 y 15 minutos de exposición; todas las muestras fueron clasificadas como NT. A pesar del Río Pardo estar localizado en una zona con amplio uso de productos agrícolas y con pocas Áreas de Preservación Permanente (APP), los resultados mostraron toxicidad apenas para o organismo *Ceriodaphnia dubia*, en la estación seca del año de 2016, posiblemente relacionada con la disminución del caudal médio del río y de la concentración de los poluentes en el água. Debe ser reconocida la importancia de mantener el control periódico por la CETESB, teniendo en cuenta el Art. 14 de la Resolución CONAMA 357/2005, que establece que "no debe haber verificación de efectos tóxicos crónicos en organismos" presentes en los rios Clase 1 y 2, en el contexto brasileño.

Palabras claves: Bioensayos, Ecotoxicología, agua superficial, Río Pardo, *Daphnia similis*, *Ceriodaphnia dubia*, *Vibrio fischeri*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa representativo das 7 regiões hidrográficas que compõem o Estado de São Paulo. Fonte: Secretaria da Educação do Estado de São Paulo, Secretaria de Saneamento e Recursos Hídricos e Departamento de Águas e Energia Elétrica.	31
Figura 2. Mapa das 22 Unidades de Gerenciamento de Recursos Hídricos - UGRHIs do Estado de São Paulo. Fonte: Secretaria da Educação do Estado de São Paulo, Secretaria de Saneamento e Recursos Hídricos e Departamento de Águas e Energia Elétrica.	31
Figura 3. Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos (UGRHI) 04 - Pardo (realce em vermelho), onde foram realizadas as amostragens do presente estudo.	33
Figura 4. <i>Daphnia</i> spp., Fêmea adulta (STANDARD METHODS, 2011).	48
Figura 5. A- <i>Ceriodaphnia dubia</i> ; B- “garra”; C- “pós-abdômen” (STANDARD METHODS, 2011).	49
Figura 6. Bactéria marinha luminescente <i>Vibrio fischeri</i> . Fonte: Google.	51
Figura 7. Mapa representativo dos pontos de amostragem no Rio Pardo e vista parcial dos pontos de amostragem no Rio Pardo (MACHADO, 2016).	56
Figura 8. Perfil pluviométrico mensal de Ribeirão Preto - SP, valor médio obtido no período de 1º de janeiro de 2006 a 31 de dezembro de 2016 (CIIAGRO, 2017).	57
Figura 9. Cultivo de organismos de <i>Daphnia similis</i> e <i>Ceriodaphnia dubia</i>	61
Figura 10. Sistema MICROTOX®, modelo 500.	67
Figura 11. Correlação de efeito entre a concentração e a redução da luminescência, no dia 25 de fevereiro de 2016.	74
Figura 12. Correlação de efeito entre a concentração e a redução da luminescência, no dia 25 de outubro de 2016.	75
Figura 13. Comparação temporal dos ensaios de toxicidade crônica para <i>Ceriodaphnia dubia</i> , nas estações chuvosa e seca, no período 2010-2016. (Dados de 2010-2015 foram fornecidos pela CETESB e dados de 2016 foram obtidos no presente estudo).	78
Figura 14. Correlação de efeito entre a concentração e a redução da luminescência, na estação chuvosa.	80
Figura 15. Correlação de efeito entre a concentração e a redução da luminescência, na estação seca.	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Pontos de amostragem de dados no Rio Pardo, municípios próximos aos pontos e localização geográfica.	55
Tabela 2 - Concentração de Cloreto de Potássio (KCl), para CE50 48h, dos organismos (<i>Daphnia similis</i>) expostos no período de janeiro a dezembro de 2016.....	71
Tabela 3: Concentração de Cloreto de Sódio (NaCl), para CE50 7 dias, dos organismos (<i>Ceriodaphnia dubia</i>) expostos no período de janeiro a dezembro de 2016.....	72
Tabela 4 - Valores de CE50 obtidos nos ensaios de sensibilidade com <i>Vibrio fischeri</i> após exposição ao Sulfato de Zinco por 15 minutos nos ensaios de sensibilidade realizados no ano de 2016.	73
Tabela 5 - Correlação de efeito entre a concentração e a redução da luminescência, no teste de sensibilidade ao Sulfato de Zinco realizado no dia 25 fev/16.	73
Tabela 6 - Correlação de efeito entre a concentração e a redução da luminescência, no teste de sensibilidade ao Sulfato de Zinco realizado no dia 25 out/16.	74
Tabela 7 - Resultados obtidos no ensaio de toxicidade aguda com <i>Daphnia similis</i>	76
Tabela 8 - Resultados obtidos no ensaio de toxicidade crônica com <i>Ceriodaphnia dubia</i>	76
Tabela 9 - Luminescência emitida pela bactéria marinha <i>Vibrio fischeri</i> , antes de entrar em contato com as amostras (0 min), após 5 e 15 minutos de exposição, na estação chuvosa.....	80
Tabela 10 - Correlação de efeito entre a concentração e a redução da luminescência, na estação chuvosa.	80
Tabela 11 - Luminescência emitida pela bactéria marinha <i>Vibrio fischeri</i> , antes de entrar em contato com as amostras (0 min), após 5 e 15 minutos de exposição, na estação seca.	81
Tabela 12 - Correlação de efeito entre a concentração e a redução da luminescência, na estação seca.	81
Tabela 13. Resultados dos parâmetros Oxigênio Dissolvido (OD) e pH, para o ensaio com <i>Daphnia similis</i> , nas estações chuvosa e seca.	82
Tabela 14 - Resultados dos parâmetros Oxigênio Dissolvido (OD) e pH, para o ensaio com <i>Ceriodaphnia dubia</i> , nas estações chuvosa e seca.	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas

ANA - Agência Nacional das Águas

CBH - Comitê de Bacia Hidrográfica

CBH Pardo - Comitê da Bacia Hidrográfica do Rio Pardo

CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente

OMS - Organização Mundial da Saúde

ONU - Organização das Nações Unidas

UGRHI - Unidade de Gerenciamento dos Recursos Hídricos

U.S.EPA - US Environmental Protection Agency

WHO - World Health Organization

WWDR - World Water Development Report

Al - Alumínio

As - Arsênio

Be - Berílio

Cd - Cádmio

Cr - Crômio

Cu - Cobre

Pb - Chumbo

Mn - Manganês

Hg - Mercúrio

Ni - Níquel

Tl - Tálho

Zn - Zinco

°C - Graus Celsius

15' - Após 15 minutos

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVOS.....	23
2.1 Objetivo Geral.....	23
2.2 Objetivos Específicos	23
3. REVISÃO DE LITERATURA	25
3.1 Disponibilidade e qualidade da água no mundo	25
3.2 O cenário brasileiro.....	27
3.3 Comitês de Bacias Hidrográficas.....	29
3.4 Bacia Hidrográfica do Rio Pardo (UGRHI 04)	32
3.5 Contaminação dos recursos hídricos.....	35
3.6 Contaminantes químicos.....	36
3.7 Metais.....	37
3.8 Pesticidas	41
3.9 A Ecotoxicologia	43
3.10 Testes de toxicidade com organismos aquáticos	45
3.11 Microcrustáceos	47
3.12 <i>Daphnia similis</i>	47
3.13 <i>Ceriodaphnia dubia</i>	49
3.14 <i>Vibrio fischeri</i>	51
4. MATERIAL E MÉTODOS	54
4.1 Local de estudo e pontos de amostragem	54
4.2 Campanhas de amostragem	57
4.3 Análise de parâmetros físico-químicos.....	57
4.4 Amostragem.....	58
4.4.1 <i>Daphnia similis</i> e <i>Ceriodaphnia dubia</i>	58
4.4.2 <i>Vibrio fischeri</i>	58

4.5 Ensaio ecotoxicológico.....	58
4.5.1 <i>Daphnia similis</i>	58
4.5.1.1 Meio de cultivo de <i>Daphnia similis</i>	59
4.5.1.2 Soluções utilizadas	59
4.5.1.3 Manutenção de <i>Daphnia similis</i>	61
4.5.1.4 Teste de sensibilidade de <i>Daphnia similis</i> ao Cloreto de Potássio	61
4.5.1.5 Ensaio de toxicidade aguda de água superficial com <i>Daphnia similis</i>	62
4.5.2 <i>Ceriodaphnia dubia</i>	62
4.5.2.1 Meio de cultivo de <i>Ceriodaphnia dubia</i>	63
4.5.2.2 Manutenção da <i>Ceriodaphnia dubia</i>	63
4.5.2.3 Teste de sensibilidade de <i>Ceriodaphnia dubia</i> ao Cloreto de Sódio.....	63
4.5.2.4 Ensaio de toxicidade crônica de água superficial com <i>Ceriodaphnia dubia</i>	64
4.5.3 <i>Vibrio fischeri</i>	65
4.5.3.1 Soluções utilizadas	65
4.5.3.2 Organismo teste.....	65
4.5.3.3 Teste de sensibilidade de <i>Vibrio fischeri</i> ao Sulfato de Zinco	66
4.5.3.4 Ensaio de toxicidade aguda de água superficial com <i>Vibrio fischeri</i>	66
4.6 Carta Controle	67
4.7 Análise estatística	68
5. RESULTADOS	71
5.1. Sensibilidade de <i>Daphnia similis</i> ao Cloreto de Potássio	71
5.2 Sensibilidade de <i>Ceriodaphnia dubia</i> ao Cloreto de Sódio	72
5.3 Sensibilidade de <i>Vibrio fischeri</i> ao Sulfato de Zinco.....	73
5.2 Ensaio de toxicidade.....	75
5.2.1 Ensaio de toxicidade aguda com <i>Daphnia similis</i>	75
5.2.2 Ensaio de toxicidade crônica com <i>Ceriodaphnia dubia</i>	76
5.2.3 Comparação de dados institucionais com os dados obtidos no presente estudo	77
5.2.4 Ensaio de toxicidade aguda com <i>Vibrio fischeri</i>	79
5.2.4.1 Estação chuvosa	80
5.2.4.2 Estação seca.....	81
5.3 Parâmetros físico-químicos.....	82

6. DISCUSSÃO.....	85
7. CONCLUSÕES.....	94
8. REFERÊNCIAS	97
9. ANEXOS.....	112

1. INTRODUÇÃO

Desde a segurança energética e alimentar até a saúde ambiental e humana, a água - elemento fundamental para a vida - é um importante recurso natural que contribui para melhorias no bem-estar social e crescimento inclusivo (WWDR, 2015; RAMOS et al., 2016). A presença de produtos químicos, rejeitos radioativos e agentes infecciosos podem comprometer sua qualidade, afetando os meios de subsistência de milhões de pessoas (WHO, 2011; WWDR, 2015).

Alterações adversas desse recurso podem contribuir para a degradação da qualidade ambiental de ecossistemas aquáticos e terrestres. Esta degradação ambiental pode afetar, direta ou indiretamente: a saúde, a segurança e o bem-estar da população; as atividades sociais e econômicas; a fauna e a flora; as condições estéticas e sanitárias do meio; e a própria qualidade dos recursos hídricos (CONAMA, 1986; ZEGURA et al., 2009; WIECZERZAK; NAMIESNIK; KUDLAK, 2016).

As civilizações antepassadas foram se estruturando ao redor das bacias hidrográficas. A sobrevivência dos povos dependia de um elemento vital, a água, cujo domínio sempre foi um alvo a ser alcançado (PINTO-COELHO, 2016). A história da civilização está relacionada com as diversas formas com que os seres humanos aprenderam a manipular os recursos hídricos. Muitas comunidades emergiram perto de rios ou onde a água pudesse ser obtida de modo a garantir a produção de alimentos necessários para a manutenção da população. Os canais simples de irrigação permitiram um aumento da produção agrícola, principalmente em épocas de seca (GLEICK, 2001; ALVES, 2009, SUN et al., 2013).

Contudo, desde que o homem passou a aproveitar os recursos hídricos para a produção de alimentos, aprendeu que neles também poderiam ser descartados (lançados e diluídos) seus resíduos, sem se dar conta de que todos os níveis de organização biológica seriam atingidos. Assim, as características naturais desse recurso não estão sendo mantidas, causando poluições

orgânicas e tóxicas, eutrofização e sérios distúrbios ecológicos (BORRELY, 2001; WANG; YANG, 2016).

Considerando-se o panorama mundial dos recursos hídricos, observam-se sucessivas preocupações quanto à disponibilidade e à qualidade da água relacionadas aos múltiplos usos a que se pretende destiná-la. A disponibilidade hídrica de outros países, quando comparada à do Brasil, indica que o país ocupa posição privilegiada quanto ao acesso à água. Contudo, devido à má distribuição dos recursos hídricos e à ocupação desequilibrada do território brasileiro, tem-se como resultado cenários de escassez de água em diversos locais, como foi o caso da crise hídrica enfrentada pela região sudeste do país entre os anos de 2013 e 2015 (NOBRE et al., 2016), o que levou à diminuição da vazão dos rios, evidenciando a maior concentração de contaminantes, principalmente nas estações secas.

Em decorrência disso, foram abordadas questões relacionadas à qualidade dos recursos de abastecimento em períodos de escassez e questionamentos sobre possíveis fontes alternativas de abastecimento (MACHADO, 2016). A demanda por água como fonte de abastecimento e para uso em atividades industriais e agrícolas está aumentando continuamente ao longo dos anos. Atualmente, o município de Ribeirão Preto/SP é abastecido exclusivamente pelo Aquífero Guarani, que vem sofrendo as consequências dessa exploração, e a recarga do aquífero pode não acompanhar a velocidade de extração, gerando diminuição na disponibilidade de água (MACHADO, 2016).

Existe uma clara tendência de crescimento da população nas proximidades do Rio Pardo, bem como as atividades econômicas, com consequentes impactos sobre os recursos hídricos. Frente a essa realidade que estabelece um aumento na demanda de fontes de água para o consumo da população, o Rio Pardo, que já vem sendo utilizado como fonte de abastecimento de água, apresenta-se como alternativa estratégica para o abastecimento parcial de Ribeirão Preto no futuro, o que evidencia a importância deste estudo.

Órgãos governamentais do município receberam, no ano de 2013, autorização da Agência Nacional das Águas (ANA) para captação de água do Rio Pardo, o qual já é utilizado como fonte de abastecimento para o município de São José do Rio Pardo (ANA, 2013). No entanto, as características desse recurso ainda não estão totalmente esclarecidas, evidenciando a necessidade de estudos aprofundados com a finalidade de garantir o consumo seguro da água.

Para que os impactos humanos sobre os ecossistemas sejam contidos, é necessário que haja uso racional das águas naturais e a preservação das mesmas, bem como o aprimoramento de tecnologias que proporcionem melhora no tratamento de efluentes e assegurem a eficiência do abastecimento público (PINTO-COELHO, 2016).

Em vista das evidências de contaminações nos diversos ambientes, tem surgido a busca por soluções, por meio da melhoria das metodologias de estudo, da revisão de legislações dedicadas à área ambiental e pela tentativa de controle da poluição. Uma forma de avaliar as mudanças que já estão ocorrendo nos ambientes aquáticos, sob influência antrópica, é desenvolver estudos toxicológicos, por meio da aplicação de testes de toxicidade ou pelo monitoramento biológico (PELAEZ-RODRIGUEZ et al., 2000; YU et al., 2014).

Neste aspecto, o biomonitoramento é eficaz na “identificação de mecanismos e efeitos em níveis de organização biológica, principalmente, quando associados ao monitoramento simultâneo da sensibilidade ao estresse, à integração das respostas às concentrações de poluentes e à avaliação dos efeitos sinérgicos e antagônicos dos mesmos.” (CAMARGO, 2012; LE et al., 2016).

A Ecotoxicologia Aquática é uma ciência que surgiu para dar suporte no enfrentamento dos problemas de contaminação dos corpos d’água por compostos tóxicos. Seus instrumentos de análise são capazes de responder preditivamente à toxicidade de compostos químicos, sinalizando os potenciais ecotoxicológicos e seus mecanismos de ação em organismos vivos, a partir da detecção de ecotoxicidade em ambientes impactados. A inserção dos ensaios

ecotoxicológicos como ferramenta de avaliação ambiental é de fundamental importância, pois alguns fatores não são avaliados pelas variáveis abióticas, como, por exemplo, a biodisponibilidade e a interação entre os efeitos de poluentes (MAGALHÃES; FERRÃO-FILHO, 2008).

Existem organismos que podem ser utilizados como detectores de problemas causados ao meio ambiente, sendo denominados bioindicadores. Eles podem ser definidos como “organismos selecionados com os quais se podem amostrar, testar e responder às questões ambientais” (CETESB, 2011). Dentre estes organismos, destacam-se a bactéria marinha *Vibrio fischeri* e os microcrustáceos *Daphnia similis* e a *Ceriodaphnia dubia*, que são comumente utilizados como organismos-teste em ensaios ecotoxicológicos para o monitoramento ambiental (MAGALHÃES; FERRÃO-FILHO, 2008).

A implementação dos bioensaios de toxicidade aguda para a bactéria *Vibrio fischeri*, e toxicidade aguda e crônica, respectivamente, para os microcrustáceos *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia dubia*, permitirá complementar o monitoramento ambiental de metais e pesticidas que vem sendo desenvolvido no Laboratório de Ecotoxicologia e Parasitologia Ambiental (LEPA) da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, no Rio Pardo, principal corpo de água da Bacia Hidrográfica do Rio Pardo (UGRHI 04), considerando que esse corpo d'água vem sendo impactado pela ocupação urbana e pela extensa atividade agrícola praticada na região nordeste do Estado de São Paulo, nos últimos anos.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Avaliar a toxicidade de amostras de água superficial para organismos bioindicadores.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a toxicidade aguda de amostras de água superficial para *Daphnia similis*.
- Avaliar a toxicidade crônica de amostras de água superficial para *Ceriodaphnia dubia*.
- Determinar a inibição da luminescência emitida pela bactéria marinha *Vibrio fischeri*, mediante a realização de testes de toxicidade aguda em água superficial.
- Avaliar a interferência de parâmetros físico-químicos em amostras de água superficial sobre organismos bioindicadores.
- Gerar subsídios para as autoridades gestoras da Bacia Hidrográfica do Rio Pardo, considerando a previsão da utilização da água do Rio Pardo para abastecimento público.

REVISÃO DE LITERATURA

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Disponibilidade e qualidade da água no mundo

Falhas governamentais e desenvolvimento não sustentável têm afetado a qualidade e a disponibilidade de água, comprometendo sua capacidade de gerar benefícios sociais e econômicos. A demanda por água doce está crescendo. A menos que o equilíbrio entre a demanda e os suprimentos finitos sejam reestabelecidos, o mundo enfrentará um crescente déficit hídrico mundial (WWDR, 2015).

Em determinadas regiões, o aumento do consumo de água, associado à má distribuição de chuvas e vazões, tem comprometido a qualidade dos recursos hídricos. São muitos os locais que sofrem com o desabastecimento de água no mundo. Há tempos é abordado sobre as formas de gestão dos recursos hídricos a fim de conter ou reduzir esse problema (LIMA, 2000).

Em 2050, a demanda global por água está prevista para aumentar em 55% em relação à demanda atual, principalmente devido à crescente demanda da produção, geração de eletricidade térmica e também do uso doméstico (WWDR, 2015). Estima-se que a população mundial esteja em torno de 6 bilhões de habitantes e que, por volta do ano de 2050, atinja de 10 a 12 bilhões (OMM, 1997). Como resultado dessa estimativa, sabe-se que os mesmos recursos disponíveis hoje na Terra serão utilizados para atender às demandas de água, alimento, moradia, de mais 4 a 6 bilhões de pessoas.

Estima-se que o volume total de água doce, salobra e salgada na Terra seja de 1,4 bilhões de km³, sendo que apenas 0,3% de toda água doce do planeta está disponível em fontes superficiais, como lagos e rios (MANZI, 2011). O Brasil possui 13% de todas as reservas de água doce disponíveis do planeta, o que o enquadra em uma situação satisfatória em relação aos outros países. No entanto, cerca de 81% de todo esse volume encontra-se na Bacia Amazônica, região com o menor contingente populacional (5% da população brasileira) e, conseqüentemente, com a menor demanda (ANA, 2014). Já na região Sudeste, concentra-se o

maior contingente populacional, e, dessa forma, as pressões antrópicas e a demanda de água são elevadas.

Neste contexto, algumas localidades apresentaram recentemente um quadro de escassez de água, levantando discussões sobre seu uso racional, reúso e os cuidados relacionados à qualidade da água de abastecimento (ANA, 2014).

A qualidade da água de fontes superficiais, como os rios, por exemplo, está relacionada aos usos atribuídos a este recurso natural e aos despejos que o rio recebe (CLAVIJO et al., 2016). No Brasil, a Resolução CONAMA nº357/2005 dispõe sobre a classificação dos corpos de água e estabelece padrões para enquadramento em classes de acordo com a qualidade e o uso da água. Em rios de classe 2, suas águas podem ser destinadas ao abastecimento para consumo humano após tratamento convencional (clarificação com utilização de coagulação e floculação, seguida de desinfecção e correção de pH), à recreação de contato primário como a natação, esqui aquático e mergulho, à aquicultura e à atividade de pesca, dentre outros (CONAMA, 2005).

A crescente urbanização e a industrialização têm como consequências um maior comprometimento da qualidade das águas superficiais, devido, principalmente, à maior complexidade de poluentes que estão sendo lançados no meio ambiente e à deficiência do sistema de coleta e tratamento dos esgotos domésticos (CETESB, 2015).

Lançamentos de esgoto e efluentes sem tratamento adequado, poluição difusa advinda da aplicação de pesticidas na agricultura e contaminações químicas são alguns dos fatores que contribuem para a degradação dos recursos hídricos, bem como para as doenças de veiculação hídrica relacionadas à qualidade da água (CETESB, 2015).

De acordo com a CETESB (2015), o lançamento de esgotos domésticos *in natura* ou parcialmente tratados nos corpos hídricos consiste em uma das principais causas da poluição das águas. Dessa forma, a redução da qualidade das águas superficiais restringe seus múltiplos

usos e contribui para o aumento da ocorrência de doenças de veiculação hídrica, representando uma séria ameaça para a saúde humana em virtude da exposição a micro-organismos potencialmente patogênicos (GEMMELL; SCHIMIDT, 2013).

Governança deficiente, combinada a baixos rendimentos e custos de serviços, torna muito mais difícil o acesso sustentável à água, principalmente para as pessoas mais pobres. O acesso à água de qualidade, que atenda aos padrões de potabilidade, está ligado à pobreza. A redução da pobreza por meio da gestão da água é uma estratégia útil a favor dos pobres, permitindo a introdução de temas de governança inter-relacionados, qualidade da água, acesso, oportunidades de subsistência, capacitação e empoderamento, prevenção e gerenciamento de desastres relacionados à água, e gestão de ecossistemas. Exploração de novas fontes de dados, melhores modelos e poderosos métodos de análise, bem como a concepção de estratégias de gestão adaptativa, podem ajudar a encontrar respostas mais eficazes frente às mudanças e condições incertas (WWDR, 2015; PINTO-COELHO, 2016).

3.2 O cenário brasileiro

O território brasileiro, com uma área de aproximadamente 8,51 milhões de km² (publicado no DOU nº 16 de 23/01/2013, conforme Resolução Nº 01, de 15 de janeiro de 2013) (IBGE, 2013) e 204.450.649 milhões de habitantes (IBGE, 2015), é constituído de quatro grandes regiões hidrográficas. Dentre elas, destaca-se a Região Hidrográfica do Paraná, seguida pela Região Hidrográfica Amazônica, a Região Hidrográfica do Tocantins-Araguaia e a Região Hidrográfica do São Francisco.

A Região Hidrográfica do Paraná, com 32,1% da população nacional, apresenta o maior desenvolvimento econômico do país. Com uma área de 879.873 km², a região abrange os estados de São Paulo, Paraná, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Goiás, Santa Catarina e o Distrito Federal. Em 2010, aproximadamente 61,3 milhões de pessoas viviam na região, sendo 93% em áreas urbanas. A região possui a cidade mais populosa da América do Sul, São Paulo

(11,1 milhões de habitantes). O crescimento de grandes centros urbanos, como São Paulo, Curitiba e Campinas, em rios de cabeceira, tem gerado uma grande pressão sobre os recursos hídricos. Isso ocorre porque, ao mesmo tempo em que aumentam as demandas, diminui a disponibilidade de água devido à contaminação por efluentes domésticos, industriais e drenagem urbana. Esta região hidrográfica possui a maior demanda por recursos hídricos do país, equivalente a $736 \text{ m}^3/\text{s}$, que corresponde a 31% da demanda nacional (ANA, 2017).

De acordo com a ANA (2017), a Região Hidrográfica do Rio Amazonas é constituída pela mais extensa rede hidrográfica do globo terrestre, ocupando uma área total da ordem de $6.110.000 \text{ km}^2$, desde suas nascentes nos Andes Peruanos até sua foz no oceano Atlântico (na região norte do Brasil). Esta bacia continental se estende sobre vários países da América do Sul.

A Região Hidrográfica do Tocantins-Araguaia apresenta grande potencialidade para a agricultura irrigada, especialmente para o cultivo de frutíferas, de arroz e outros grãos. Atualmente, a necessidade de uso de água para irrigação corresponde a 62% da demanda total da região e se concentra na sub-bacia do Araguaia devido ao cultivo de arroz por inundação. A área irrigável é estimada em 230.197 hectares (ANA, 2017).

Fundamental pelo volume de água transportada para o semiárido, a Região Hidrográfica do São Francisco abrange 521 municípios em seis estados: Bahia, Minas Gerais, Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Goiás, além do Distrito Federal. Com 2.700 km, o Rio São Francisco nasce na Serra da Canastra, em Minas Gerais, e escoar no sentido Sul-Norte pela Bahia e Pernambuco, quando altera seu curso para o Sudeste, chegando ao Oceano Atlântico na divisa entre Alagoas e Sergipe (ANA, 2017).

Em território nacional, estima-se que a produção total hídrica no Brasil seja de aproximadamente $128.841 \text{ m}^3/\text{s}$. Se consideradas as vazões oriundas de territórios estrangeiros, a produção total hídrica no Brasil atinge valores da ordem de $227.244 \text{ m}^3/\text{s}$. Com isso, observa-

se que o Brasil tem posição privilegiada no mundo em relação à disponibilidade de recursos hídricos (ANA, 2017).

Como consequência da expansão agrícola e do aumento desordenado dos processos de urbanização e industrialização, surgem problemas relacionados à insuficiência dos recursos hídricos. A escassez hídrica no Brasil é decorrente do uso irracional das águas combinado às demandas específicas em determinadas localidades (PINTO-COELHO, 2016).

3.3 Comitês de Bacias Hidrográficas

Comitê de Bacia Hidrográfica (CBH) significa o fórum em que um grupo de pessoas se reúne para discutir sobre um interesse comum - o uso d'água na bacia (ANA, 2011). Conceito delineado a partir de duas definições, descritas a seguir:

Para Tucci (1997):

A bacia hidrográfica é uma área de captação natural da água de precipitação que faz convergir o escoamento para um único ponto de saída. A bacia hidrográfica compõe-se de um conjunto de superfícies vertentes e de uma rede de drenagem formada por cursos de água que confluem até resultar em um leito único no seu exutório.

Para Houaiss (2001), “Comitê, do latim ‘*committere*’, significa confiar, entregar, comunicar. É o termo empregado para dar significado à comissão, à junta, à delegação, à reunião de pessoas para debate e execução de ação de interesse comum”.

Os conflitos pelo uso da água não são recentes, e sim recorrentes históricos; o que se altera é a forma como as comunidades se organizam para enfrentá-los (ANA, 2011). O risco de agravamento na situação da escassez de água para consumo humano nas regiões metropolitanas do Rio de Janeiro, Belo Horizonte e São Paulo é fato verídico. Pesquisas apontam que, nos próximos 10 anos, esse fato atingirá mais de 40 milhões de pessoas, sem quaisquer ações preventivas dos governos (ALVES, 2009).

“Os Comitês de Bacia são instâncias deliberativas regionais, instaladas nas unidades de planejamento e gestão (as bacias hidrográficas); funcionam como espaço de articulação entre

as diversas partes interessadas no uso e proteção dos recursos hídricos locais” (ANA, 2007). Comitês de Bacias Hidrográficas são compostos por representantes do Poder Público (40%), da sociedade civil (20%) e de setores usuários de água (40%), foram criados no Estado de São Paulo (instituídos por Lei, no âmbito do Sistema Nacional de Recursos Hídricos e dos Sistemas Estaduais) e são considerados a base da gestão participativa e integrada da água (ANA 2007; ALVES, 2009). A composição diversificada e democrática dos Comitês contribui para que todos os setores da sociedade com interesse sobre a água tenham representação e poder de decisão sobre sua gestão (CBH, 2015).

Antes de sua criação, o gerenciamento da água era feito de forma isolada por municípios e Estado. As informações estavam dispersas em órgãos técnicos e os dados não eram sempre compatíveis. Essa falta de políticas públicas integradas e eficientes para o manejo dos recursos naturais provocou a degradação de muitos rio. Após a criação dos comitês, considerou-se as divisões das 7 regiões hidrográficas (Figura 1) que compõem o Estado de São Paulo e suas afinidades geopolíticas, e criou-se as 22 Unidades de Gerenciamento de Recursos Hídricos (UGRHIs) do Estado de São Paulo (Figura 2) (CETESB, 2015).

Em geral, as UGRHIs são formadas por um conjunto de bacias hidrográficas ou parte delas, e constituem unidades territoriais “com dimensões e características que permitam e justifiquem o gerenciamento descentralizado dos recursos hídricos” (art.20 da Lei Estadual 7663 de 30/12/1991) (BRASIL, 1991).

Figura 1. Mapa representativo das 7 regiões hidrográficas que compõem o Estado de São Paulo. Fonte: Secretaria da Educação do Estado de São Paulo, Secretaria de Saneamento e Recursos Hídricos e Departamento de Águas e Energia Elétrica.

Figura 2. Mapa das 22 Unidades de Gerenciamento de Recursos Hídricos - UGRHIs do Estado de São Paulo. Fonte: Secretaria da Educação do Estado de São Paulo, Secretaria de Saneamento e Recursos Hídricos e Departamento de Águas e Energia Elétrica.

3.4 Bacia Hidrográfica do Rio Pardo (UGRHI 04)

A Bacia Hidrográfica do Rio Pardo (UGRHI 04) (Figura 3) - localizada na região Hidrográfica da Vertente Paulista do Rio Grande - abrange todo o trecho à montante do Rio Pardo (a partir da sua confluência com o Rio Mogi-Guaçu), em uma área de 8.993 km², e abriga em seu território 2,7% da população do Estado, dos quais 95% vivem em áreas urbanas, totalizando um elevado contingente populacional com cerca de 1.092.477 habitantes. Cabe mencionar que as cidades que fazem parte da Bacia Hidrográfica do Rio Pardo possuem juntas um índice de coleta de esgoto estimado em aproximadamente 98%, tratamento em 80% e eficiência de tratamento em 70% (CBH-PARDO, 2014; SIGRH, 2017).

Os principais rios e reservatórios pertencentes à UGRHI 04 são: Rio Pardo, Rio Canoas, Rio Araraquara, Ribeirão São Pedro, Ribeirão da Floresta, Ribeirão da Prata, Rio Tambaú, Rio Verde, Rio da Fartura e Ribeirão Tamanduá; e reservatórios: Usinas de Caconde (Graminha), Euclides da Cunha e Armando Salles de Oliveira (Limoeiro). A vegetação natural remanescente ocupa uma área de 1.197 km², aproximadamente 13% da área da UGRHI. As Unidades de Conservação são: APA Morro de São Bento, EE de Ribeirão Preto, EE de Santa Maria, FE de Cajuru e RPPN Fazenda Palmira (SIGRH, 2017).

Figura 3. Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos (UGRHI) 04 - Pardo (realce em vermelho), onde foram realizadas as amostragens do presente estudo.

A região apresenta dominância em determinadas atividades econômicas. Dentre elas, destacam-se as atividades agroindustriais, voltadas para a extração e refino de óleos vegetais, papel e celulose, usinas de açúcar e álcool, bem como as indústrias alimentícias. No ramo industrial, vale ressaltar, também, as indústrias do setor de instrumentação médico-hospitalar, de precisão e de automação. Verifica-se um grande número de loteamentos e o incremento do comércio varejista. Quanto à demanda de água, a Bacia Hidrográfica se enquadra como “em industrialização”, apresentando uma disponibilidade hídrica razoável quando comparada a outras bacias do Estado, e sua qualidade de água varia de média a boa. (CETESB, 2012; SIGRH, 2015; SIGRH, 2017).

Empreendimentos industriais, assim como atividades agropecuárias na região, têm contribuído significativamente para a contaminação de rios da Bacia Hidrográfica do Rio Pardo. Os efeitos dessa contaminação para a saúde humana ainda não estão totalmente esclarecidos.

Efluentes industriais representam uma das principais fontes de compostos químicos diversificados lançados no meio ambiente pelo homem (BANERJEE; GUPTA, 2013), que frequentemente são indevidamente despejados em corpos hídricos. Essa interferência humana tem agravado o estado de degradação dos ecossistemas naturais por conta da enorme demanda de produtos manufaturados e do nível de elaboração destes compostos artificiais, que, muitas vezes, não são assimilados adequadamente pela natureza.

Cabe destacar que, de acordo com o Sistema de Informações para o Gerenciamento de Recursos Hídricos (SIGRH, 2010), o Rio Pardo, principal curso de água da UGRHI 04, é apontado como fonte alternativa de abastecimento de água para Ribeirão Preto e região no futuro, considerando as evidências que comprovam o rebaixamento do nível de água disponível no Aquífero Guarani e os indícios de contaminação de suas águas por pesticidas usados nas culturas canavieiras da região, que comprometem a continuidade das atividades de extração e distribuição da água para a população a partir dessa fonte de água subterrânea (DANTAS et al., 2009; SIGRH, 2011).

O Rio Pardo é utilizado pela população para diversas finalidades, como pesca, recreação, irrigação e abastecimento público (município de São José do Rio Pardo). A possibilidade de contaminação desse ambiente por toxicantes químicos reflete em preocupações quanto à exposição da população aos contaminantes a médio e longo prazo. Além disso, o Rio Pardo recebe águas contaminadas de seus afluentes, esgoto *in natura* de municípios que não dispõem de serviço de tratamento de esgoto, e contaminações difusas (LIU et al., 2009; CARDONA et al., 2010; MACHADO, 2016).

Dessa forma, é indubitável a relevância do monitoramento da qualidade das águas do Rio Pardo, a fim de se avaliar a toxicidade de amostras de águas superficiais para organismos bioindicadores e gerar subsídios para as autoridades gestoras da Bacia Hidrográfica do Rio Pardo, considerando a previsão da utilização de suas águas para abastecimento público.

3.5 Contaminação dos recursos hídricos

Após a captação e tratamento apropriado, as águas superficiais são bastante utilizadas pelos seres humanos. Os múltiplos usos da água são indispensáveis para um largo espectro das atividades humanas. Entre as que se destacam: o abastecimento público e industrial, a irrigação agrícola, a produção de energia elétrica, as atividades de lazer e recreação, entre outras (CETESB, 2007).

O lançamento de esgotos domésticos *in natura*, ou parcialmente tratados, consiste em uma das principais causas da poluição das águas no Estado de São Paulo. A redução da qualidade das águas dos rios, reservatórios, estuários e regiões costeiras restringe seus múltiplos usos e contribui para o aumento da ocorrência de doenças de veiculação hídrica, causadas pelo contato primário ou pela ingestão de água contaminada (CETESB, 2014). Com isso, percebe-se cada vez mais a necessidade de se olhar para questões referentes à garantia ao acesso e à qualidade da água (SAMPAIO, 2012).

A crescente expansão demográfica e industrial, observada nas últimas décadas, trouxe como consequência o comprometimento das águas superficiais e subterrâneas (CETESB, 2010). No planeta, processos de urbanização desordenada e extensivas atividades agropecuárias vêm degradando a qualidade dos recursos hídricos superficiais.

Os rios, receptores de diversas fontes de contaminação, como esgoto domiciliar, efluentes industriais e resíduos provenientes da agropecuária, podem ser afetados pelo aumento na carga de micro-organismos patogênicos e de substâncias químicas (TUCCI, 2008). A ocorrência de chuvas abaixo da média reduz a vazão dos rios, diminuindo a capacidade de diluição dos contaminantes que são lançados nos corpos hídricos, como os esgotos domésticos (CETESB, 2014).

Os poluentes disseminados nos rios, de origem biológica e química, podem afetar a saúde humana diretamente por contato dérmico e ingestão. Também, podem afetar a saúde

humana por vias indiretas ao serem introduzidos na cadeia alimentar e se acumularem em peixes, animais e plantas, que podem, mais tarde, ser ingeridos por seres humanos (PRÜSS-ÜSTÜN et al., 2008; ROVIRA et al., 2012).

3.6 Contaminantes químicos

Desde a gênese até a deposição no leito do rio, reservatório ou lago, os contaminantes químicos podem se associar a certas partículas tornando-se prontamente disponíveis para o ecossistema, ou migrando via rede trófica, do sedimento para os organismos bentônicos ou para a coluna d'água (ARAÚJO et al., 2006). Portanto, níveis elevados de contaminantes persistentes no sedimento podem ou não acarretar efeitos para a biota aquática, dependendo de uma série de fatores que alteram a biodisponibilidade e a toxicidade dos mesmos (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

Na análise dos contaminantes químicos, vêm surgindo como alternativas e complementares os ensaios ecotoxicológicos, os quais consideram interações bióticas e abióticas e medem as frações biodisponíveis dos contaminantes para o ambiente através da simulação, em campo ou em laboratório, de alguns eventos biológicos que ocorreriam nos ecossistemas examinados. Nesse caso, as amostras cujos ensaios se realizem em laboratório terão uma resposta para os organismos aquáticos selecionados para os ensaios com fenômenos possivelmente similares àqueles correspondentes em meio natural. Sob essa perspectiva, o resultado do teste de toxicidade auxilia, tanto no diagnóstico, quanto no estabelecimento de limites permissíveis de substâncias químicas, que podem estar presentes no ecossistema, ou seja, concentrações em que a biota não é afetada (LÓPEZ-DOVAL et al., 2016; ARAGÃO; ARAÚJO, 2006).

Diversos estudos são realizados hoje para avaliar a toxicidade em atividades industriais e para o monitoramento das águas. Porém, em grandes corpos d'água nem sempre é possível

identificar efeitos agudos e mesmo crônicos; embora muitas vezes esse ambiente já esteja muito comprometido (BORRELY, 2002; CETESB, 2007).

Dados os riscos ambientais, é fundamental estudar as interferências que atividades industriais causam ao entorno, incluindo corpos d'água receptores de seus efluentes. Atividades humanas podem provocar a liberação de grandes quantidades de poluentes tóxicos para o ambiente. Entre eles, podemos citar os metais.

3.7 Metais

A especiação de metais nos ecossistemas aquáticos compreende a distribuição de várias formas físico-químicas nos compartimentos (coluna d'água e seus particulados suspensos, sedimentos e águas intersticiais). Os metais podem estar presentes em diversas formas. São elas: livre e dissolvida (metálicos, mono e polivalentes-hidratados); complexada (fraca ou fortemente, pela matéria orgânica dissolvida - geopolímero, ácidos húmicos e fúlvicos); complexos solúveis (na fração de lipídios presentes na água); adsorvidos (nas partículas coloidais e nos particulados orgânicos e inorgânicos suspensos na água); e insolubilizada (usualmente como sulfetos e carbonatos) (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

Os metais são poluentes e podem alcançar a água por meio de várias rotas e, conseqüentemente, prejudicar a qualidade dos ecossistemas e também a saúde humana (ALHASHEMI et al., 2012; BAO et al., 2012; FURTULA et al., 2012; ROVIRA et al., 2011; YI et al., 2011). Os metais estão entre os poluentes de maior interesse público, não só pela sua toxicidade notável, mas também devido à sua capacidade de bioacumulação, persistência e capacidade de transporte de longo alcance (AJIMA et al., 2015; GASPARIK et al., 2010).

Os metais podem ficar retidos no solo, seja dissolvidos em solução ou fixados por processos de adsorção, complexação e precipitação. Também podem ser absorvidos pelas plantas, e, assim, incorporados às cadeias tróficas, passar para a atmosfera por volatilização ou mover-se para águas superficiais ou subterrâneas.

A disponibilidade química dos metais depende de sua espécie e das características do meio, como pH, potencial de oxirredução da água, presença de cátions competidores (Ca^{+2} , Fe^{+2} , Mg^{+2}) e concentração de ligantes orgânicos e inorgânicos aos quais o metal pode se complexar ou se adsorver. Quanto maior a disponibilidade, maior o potencial tóxico ou a bioacumulação da substância (CHASIN; PEDROZO, 2003).

Geralmente, as concentrações de metais na água de consumo são medidas no ponto de distribuição dos sistemas de abastecimento, mas os sistemas de distribuição no interior das casas (tubos, recipientes de armazenamento, etc.) podem contribuir de maneira significativa na concentração de metais na água (GRAZIANO et al., 1996).

Dentre os metais, podemos citar: alumínio (Al), manganês (Mn), mercúrio (Hg), berílio (Be), cádmio (Cd), cobre (Cu), zinco (Zn), arsênico (As), tálio (Tl), crômio (Cr), chumbo (Pb) e níquel (Ni) como os de maior interesse, devido a seus efeitos à saúde humana (PEIRANO, 2003; SEGURA-MUÑOZ et al., 2006).

O alumínio em elevadas concentrações apresenta toxicidade aos seres humanos, sendo os principais efeitos associados à neurotoxicidade e desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, como Doença de Alzheimer (MEDEIROS et al., 2012).

O manganês é extremamente importante às funções vitais de animais e para crescimento de plantas. Além disso, é um metal amplamente utilizado em processos de indústrias siderúrgicas; em pilhas; como fertilizantes; palitos de fósforo; fogos de artifício; inibidores de fumaça; na indústria química; têxtil; fungicidas; e, em pequenas quantidades, no medicamento mangafodipir trissódio (MnDPDP), como contraste na imagem por ressonância magnética. Porém, em elevadas quantidades, pode ser tóxico aos sistemas respiratório e nervoso central. O Mn é frequentemente transportado nos rios adsorvido aos sedimentos suspensos (CETESB, 2012).

O mercúrio é um metal com elevado potencial tóxico devido à sua capacidade de bioacumulação nos organismos e acúmulo progressivo de substâncias de um nível trófico para outro ao longo da teia alimentar. No organismo, o mercúrio é altamente reativo, podendo induzir modificações estruturais e funcionais (FIGUEIREDO et al., 2016). O Hg é um dos elementos que apresenta maior risco à saúde humana, principalmente pela via respiratória (sob a forma de vapor) ou ingerido (sob a forma de metil-Hg). Dentre os efeitos nocivos do mercúrio temos os danos irreversíveis causados ao sistema nervoso central, afetando funções sensoriais, visuais, auditivas e motoras, podendo levar à morte em casos agudos (BASTOS; LACERDA, 2004).

O berílio é uma substância utilizada na fabricação de bens de consumo eletroeletrônicos, e a exposição humana ao berílio pode levar a doenças como beriliose, câncer do pulmão e doenças da pele (GERBASE; OLIVEIRA, 2012).

A produção mundial de cádmio está em torno de 15.000 toneladas/ano, sendo utilizado principalmente em galvanoplastia e como constituinte de pigmentos e estabilizantes de plásticos. Fertilizantes fosfatados e drenagem de minas representam também fontes consideráveis desse metal. Trata-se de um metal altamente tóxico a algumas formas de vida, acumulando-se em micro-organismos, tecidos vegetais e animais (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006). Intoxicações por cádmio também podem causar danos nos rins, tumores, hipertensão, diminuição na capacidade reprodutiva e disfunção hepática (RAHMAN et al., 2012).

O cobre é um elemento essencial, necessário aos organismos, porém, em quantidades reduzidas. Em concentrações superiores aos limites exigidos, pode desencadear respostas tóxicas, com significativo potencial para bioacumulação. A exposição ao cobre em concentrações elevadas pode causar lesões nos rins, nefrite e anúria (RAHMAN et al., 2012). Entre as fontes naturais de cobre encontram-se o intemperismo e as atividades vulcânicas. Como fontes antrópicas destacam-se a mineração, atividades de fundição, incineração e

estações de fungicidas, bactericidas, algicidas, fertilizantes e tintas anti-incrustantes (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

O zinco, apesar de essencial para os organismos vivos, pode vir a ser tóxico caso a ingestão exceda os níveis considerados seguros. Entretanto, seu déficit pode provocar doenças ou disfunções (VIRGA et al., 2007). O Zn em níveis extremos também pode causar nefrite, anúria e lesões nos rins (RAHMAN et al., 2012).

O arsênio, metal que pode ser liberado no ambiente através do contato da água (de rios e nascentes) com rochas que apresentam elevada concentração do mesmo, pode provocar vários tipos de cânceres, como o de pele, pâncreas e pulmão, além de abalos ao sistema nervoso, malformação neurológica e abortos. A ação antrópica exerce impacto no meio ambiente por meio de atividades como mineração e combustão de combustíveis fósseis. Embora o uso de pesticidas contendo arsênio tenha diminuído significativamente nas últimas décadas, o uso como conservante de madeira ainda é comum (WHO, 2014).

O tálio é um metal volátil utilizado como veneno para ratos e presente em combustíveis fósseis. A queima desses combustíveis redistribui o tálio para a atmosfera, podendo precipitar e contaminar os corpos de água, peixes e o solo. Os sintomas da intoxicação por tálio são dor de cabeça, náuseas, dores musculares, fadiga, distúrbios do sono (MILANEZ et al., 2009).

O crômio, no estado trivalente, é benéfico em pequenas quantidades, participando do metabolismo do corpo humano. Porém, no estado de oxidação hexavalente, possui ação cancerígena (REPULA et al., 2012).

O chumbo é um metal com amplo uso em indústrias de tintas, baterias, tubulações e como aditivo em derivados do petróleo. Está presente em concentrações consideráveis no meio urbano e apresenta elevada toxicidade principalmente para o sistema nervoso central (REPULA et al., 2012).

O níquel é utilizado na fabricação de aço inoxidável; fabricação de margarina e manteiga (catalisador); produção de baterias alcalinas; próteses clínicas dentárias; moedas; entres outros. No entanto, em quantidades significativas, pode ter efeitos graves à saúde humana, como bronquite crônica, diminuição da função pulmonar e câncer, foram relatados em trabalhadores de refinarias e indústrias de processamento de níquel (AZEVEDO; CHASIN, 2003).

Organismos como as plantas estão expostos à grande parte dos metais presentes no ambiente terrestre (NADAL et al., 2011). Tradando-se do ambiente aquático, os metais apresentam grande tendência em se acumular nos tecidos dos peixes por meio do contato pelas brânquias; ingestão de água; ingestão de outros peixes; algas ou invertebrados. Os peixes contaminados pelos metais, ao serem consumidos por seres humanos, podem causar doenças crônicas e agudas (MACHADO, 2016).

3.8 Pesticidas

São denominados pesticidas “produtos que podem matar um organismo indesejável ou controlá-lo (interferindo na sua reprodução)”, e normalmente são referidos de acordo com o tipo de praga que controlam (U.S. EPA, 2012).

Com relação ao cenário agrícola brasileiro, sabe-se que o país é mundialmente conhecido por seu grande potencial. Por ano, no Brasil, são produzidas cerca de 739.267.042 toneladas de cana-de-açúcar; 22.126.440 toneladas de produtos advindos de culturas perenes (como laranja e café); os cereais, as leguminosas e as oleaginosas somam aproximadamente 188.185.652 toneladas (IBGE, 2014).

O uso de pesticidas para fim agrícola, especialmente em culturas de cana de-açúcar, é bastante antigo, e há cerca de 20 anos intensificou-se ainda mais. O uso abusivo destes produtos decorre principalmente da proibição do processo de queima da palha da cana-de-açúcar, que resulta na necessidade de aplicação de maiores quantidades de pesticidas para o controle de plantas daninhas - antes controladas com o uso do fogo (AZANIA et al., 2002).

Os pesticidas, por suas vezes, amplamente utilizados no contexto atual, representam também significância sanitária do ponto de vista da saúde ambiental e humana (BAO et al., 2012). De acordo com sua composição química, podem ser classificados em diferentes grupos.

Os pesticidas triazínicos são muito utilizados como herbicidas no controle pré e pós-emergente nas culturas de milho, cana-de-açúcar, sorgo, abacaxi, banana, café, uvas, entre outras; são tóxicos, altamente resistentes e persistem muitos anos no solo, nas águas, plantas e animais (GARBELLINI; ULIANA, 2007).

Pesticidas organoclorados foram usados por muito tempo como inseticidas. Esforços de órgãos governamentais têm sido feitos nas últimas décadas visando documentar a contaminação e regulamentar o uso dessas substâncias, visando impedir que suas concentrações atinjam níveis perigosos à saúde (BAIRD, 2011).

O uso e aplicação desse grupo de pesticidas foi reduzido drasticamente, especialmente o aldrin, dieldrin, heptacloro, mirex, clordecona. Outros foram até retirados do mercado, devido aos seus efeitos à saúde e ao ambiente e sua persistência, como, por exemplo, o DDT e o clordano. Embora seu uso esteja proibido para determinados fins, ainda estão presentes no ambiente produtos de uso doméstico e alguns produtos de controle de pragas agrícolas, estruturais e ambientais, podendo causar impacto significativo sobre populações, especialmente de aves aquáticas (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006; U.S. EPA, 1999).

Considerando que o uso de pesticidas sintéticos tem resultado em insatisfações, especialmente por comprometerem a qualidade dos recursos naturais, apresentarem riscos à saúde humana e ameaçarem a biodiversidade, novos padrões devem ser estabelecidos para o controle de pragas agrícolas de modo que assegurem os interesses da sociedade, não contaminem os recursos naturais e sejam ao mesmo tempo eficientes no controle de insetos e plantas daninhas (SOUZA-FILHO et al., 2005).

A quantificação de metais e pesticidas em rios permite a caracterização dos contaminantes presentes nos cursos de água. No entanto, fornece insuficiente informação sobre o potencial toxicológico das substâncias contaminantes (ROIG et al., 2011). Sabe-se que os efeitos dos compostos químicos para a biota aquática dependem de uma série de fatores que alteram sua biodisponibilidade e toxicidade (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008). A toxicidade de um contaminante está relacionada a diversos fatores, tais como: tipo e concentração; espécie química; condições ambientais e efeitos sinérgicos entre os compostos; dentre outros (ROIG et al., 2011). No corpo hídrico, os contaminantes podem associar-se a partículas que aumentam sua biodisponibilidade, sofrer transformações para formas mais ou menos tóxicas e organismos bentônicos via rede trófica (ARAÚJO et al., 2006).

Nesse contexto, a complementação do monitoramento químico de toxicantes - como metais e pesticidas utilizando bioensaios de ecotoxicidade - permite obter respostas exploratórias sobre a toxicidade dos compostos nos ecossistemas fluviais (CHAPMAN, 2007).

3.9 A Ecotoxicologia

A Ecologia é a disciplina que se ocupa das relações entre os seres vivos e o ambiente. Pode ser também conceituada como o estudo do aproveitamento e da distribuição da energia no sistema. Por outro lado, a Toxicologia estuda os efeitos adversos de determinada substância num dado organismo e procura clarear o mecanismo de ação tóxica no mesmo. Embora sejam duas ciências com estruturas e direcionamentos distintos, ambas estão ligadas aos problemas de poluição ambiental (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

O uso dos testes ecotoxicológicos integra os conceitos da Ecologia, no que diz respeito à diversidade e representatividade dos organismos e seu significado ecológico nos ecossistemas, e da Toxicidade, em relação aos efeitos adversos dos poluentes sobre as comunidades biológicas (PLAA, 1982).

Em função desses aspectos, na década de 1970, toxicologistas e ecologistas perceberam que havia algo em comum entre essas duas disciplinas. Assim, houve uma associação dos conhecimentos da Ecologia com os da Toxicologia, surgindo a Ecotoxicologia.

O termo “Ecotoxicologia” foi sugerido pela primeira vez em junho de 1969, durante uma reunião do Committee of International Council of Scientific Unions (ICSU), em Estocolmo, pelo toxicologista francês René Truhaut (TRUHAUT, 1977).

A definição de Ecotoxicologia, depois de ser bastante discutida, foi definida como:

A ciência que estuda os efeitos das substâncias naturais ou sintéticas sobre os organismos vivos, populações e comunidades, animais ou vegetais, terrestres ou aquáticos, que constituem a biosfera, incluindo assim a interação das substâncias com o meio nos quais os organismos vivem num contexto integrado (PLAA, 1982).

A Ecotoxicologia recebe outras definições bastante semelhantes entre si, como:

É a ciência que tem por objetivo estudar as modalidades de contaminação do ambiente pelos poluentes naturais e sintéticos, produzidos por atividades humanas, seus mecanismos de ação e seus efeitos sobre o conjunto de seres vivos que habitam a biosfera (RAMADE, 1977).

Para Ronco et al. (2004) e Kendall et al. (2001), “a ecotoxicologia é a área especializada da toxicologia ambiental que centra seus estudos nos efeitos ocasionados por agentes químicos e físicos sobre a dinâmica de populações e comunidades integrantes de ecossistemas definidos”.

Para Silva et al. (2015), “a ecotoxicologia descreve a relação entre os poluentes químicos, o ambiente em que são liberados e os organismos que ali vivem”.

Os testes ecotoxicológicos, ou bioensaios, para monitoramento e avaliação da qualidade da água, têm se tornado bastante comuns nos últimos anos no Brasil. A primeira iniciativa em termos metodológicos na área de Ecotoxicologia se deu em 1975, num programa internacional de padronização de testes de toxicidade aguda com peixes, desenvolvido pelo Comitê Técnico de Qualidade das Águas TC da *International Organization for Standardization* (ISO). A Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) participou desse programa a convite da Associação Brasileira de Normas Técnicas. A partir de 1975, foram desenvolvidos e adaptados vários métodos de ensaios de toxicidade aguda e

crônica, de curta duração, utilizando alguns grupos e espécies de organismos, dentre os quais se destacam as algas, os microcrustáceos e os peixes de águas continentais e marinhas e os testes em sedimentos (MONTES et al., 2010; ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

Como a maioria das outras ciências, a Ecotoxicologia também recebe uma subdivisão, a qual se relaciona ainda mais ao tema central deste estudo, a Ecotoxicologia Aquática.

A Ecotoxicologia Aquática tem como objetivo avaliar o efeito de substâncias químicas tóxicas sobre organismos representativos do ecossistema aquático (ALBINATI et al., 2016). Os efeitos tóxicos podem se manifestar em diferentes níveis de organização, desde estruturas celulares até indivíduos, populações e comunidades (RONCO et al., 2004; ADAMS; ROWLAND, 2003).

A Ecotoxicologia Aquática envolve o transporte, a distribuição, a transformação e o destino final dos contaminantes no ambiente aquático. Os testes de toxicidade aquática são bastante utilizados porque os ecossistemas aquáticos constituem os principais receptáculos de contaminantes, sejam eles lançados diretamente nos corpos d'água por meio das descargas de efluentes, emitidos no ar ou depositados nos solos (GERARDI-GOLDSTEIN et al., 1990; KENDALL et al., 2001).

3.10 Testes de toxicidade com organismos aquáticos

Testes de toxicidade são ensaios laboratoriais, realizados sob condições experimentais específicas e controladas, utilizados para estimar a toxicidade de substâncias, efluentes industriais e amostras ambientais. Nesses ensaios, organismos-testes são expostos a diferentes concentrações de contaminantes e os efeitos tóxicos produzidos sobre eles são observados e quantificados (RIBO, 1997; RONCO et al., 2004; DORNFELD, 2002).

A toxicidade é uma propriedade que reflete o potencial de uma substância em causar um efeito danoso a um organismo vivo. Ela depende da concentração e das propriedades da substância química à qual o organismo é exposto e também do tempo de exposição (RAND et

al., 1995). A fim de verificar a toxicidade, é necessária a realização de análises ecotoxicológicas, também conhecidas por bioensaios, as quais visam determinar os efeitos deletérios para a comunidade aquática causada por agente tóxico (ALVES; SILVANO, 2006).

Tradicionalmente, os testes de toxicidade aquática são utilizados para medir os efeitos tóxicos de substâncias particulares e de águas contaminadas. Dados de toxicidade são utilizados para comparar diferentes substâncias químicas, além de permitir comparar a sensibilidade de diferentes organismos aquáticos a uma mesma substância (RAND et al. 1995).

Os testes de toxicidade podem ser classificados em agudos e crônicos (ALBINATI et al., 2016). Esses testes diferem na duração e nas respostas finais que são medidas. Os testes de toxicidade aguda são utilizados para medir os efeitos de agentes tóxicos sobre espécies aquáticas durante um curto período de tempo em relação ao período de vida do organismo-teste (GERARDI-GOLDSTEIN et al., 1990). Já os testes de toxicidade crônica são realizados para medir os efeitos de substâncias químicas sobre espécies aquáticas por um período que pode abranger parte ou todo o ciclo de vida do organismo-teste.

Dentre esses testes, o que utiliza a bactéria marinha bioluminescente *Vibrio fischeri* recebe o nome de MICROTOX®, é, sem dúvida, o mais utilizado (ZWART, 1983; COLEMAN; QURESHI, 1985; BOLUDA et al., 2002; WADHIA; THOMPSON, 2007). MICROTOX® é um teste de toxicidade rápido, sensível, fácil de executar e que pode ser utilizado no controle da poluição das águas e efluentes industriais (HARMEL, 2004).

Inúmeros organismos, denominados bioindicadores, podem ser definidos como “organismos selecionados com os quais se pode amostrar, testar e responder às questões ambientais”, podendo ser utilizados como detectores de problemas causados ao meio ambiente (CETESB, 2011).

Dentre esses bioindicadores destacam-se os microcrustáceos *Daphnia similis* e a *Ceriodaphnia dubia*, que são organismos filtradores, fazem parte do zooplâncton de água doce

e têm sido frequentemente utilizados como organismos-testes em ensaios ecotoxicológicos para o monitoramento ambiental. Vantagens como: cultivo barato e fácil em laboratório; utilização de pequeno espaço físico e curto ciclo de vida e curto período de gestação fazem com que estes organismos sejam bastante utilizados em ensaios experimentais (CAMARGO, 2012).

3.11 Microcrustáceos

Os microcrustáceos são organismos importantes na cadeia alimentar, pois fazem parte do zooplâncton, representando uma ligação entre os produtores primários e os consumidores secundários, já que se alimentam de algas e servem de alimento para peixes e alguns invertebrados. Vê-se, portanto, que a alteração na população e no comportamento destes organismos pode interferir em outros níveis tróficos do ecossistema aquático.

Os organismos *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia dubia* possuem um corpo coberto por uma carapaça transparente e um olho composto evidente, sensível a variações de intensidade de luz. Possuem longas antenas, que são responsáveis pelo impulso natatório para frente. São filtradores e alimentam-se de algas, bactérias e detritos orgânicos (CETESB, 1997).

Em condições ambientais adequadas, esses organismos apresentam reprodução assexuada por partenogênese, em que as fêmeas produzem células diploides que originam outras fêmeas com o mesmo genótipo, assim apresentando homogeneidade genética, o que permite boa reprodutibilidade dos resultados dos ensaios de toxicidade (GERARDI-GOLDSTEIN, 1983).

3.12 *Daphnia similis*

Daphnia similis (Figura 4) são pequenos crustáceos de água doce, com comprimento que varia de 0,2 mm a 3,0 mm, pertencentes à Ordem Cladocera, que atuam como consumidores primários na cadeia alimentar aquática e se alimentam de bactérias, algas, protozoários e detritos orgânicos presentes na água, por meio de filtração. “A filtração é essencialmente efetuada pelas

patas torácicas, que agem como peneiras para selecionar as partículas presentes na água. Em seguida, o alimento é transferido para a boca, triturado na mandíbula e levado ao intestino, tendo uma retenção no organismo de até 3 horas. O sistema enzimático é complexo, permitindo, portanto, a assimilação e a digestão da matéria orgânica sob diferentes formas” (ABNT, 2009; STANDARD METHODS, 2011; SHARMA; LANGER; NOORANI, 2016).

Figura 4. *Daphnia* spp., Fêmea adulta (STANDARD METHODS, 2011).

Daphnia similis se reproduzem, geralmente, por partenogênese, em que “as fêmeas produzem células diploides que originam fêmeas com o mesmo genótipo, resultando, portanto em uma população inteiramente de fêmeas”. Normalmente, a *Daphnia similis* se torna reprodutiva cinco a dez dias depois de seu nascimento. Em casos de condições desfavoráveis - “alta densidade de organismos, com acúmulo de produtos de excreção; redução da disponibilidade de alimento; alterações do foto período; mudanças de temperatura; etc.” - podem aparecer machos e fêmeas produtoras de óvulos haploides. (STANDARD METHODS, 2011; SHARMA; LANGER; NOORANI, 2016).

Os organismos deste gênero são popularmente conhecidos como “pulga d’água” e têm larga distribuição no hemisfério norte. *Daphnia similis* são valiosos como organismos-teste por causa de sua sensibilidade a substâncias tóxicas, a facilidade de identificação e manuseamento, e distribuição global; sendo amplamente utilizados em testes de toxicidade (ABNT, 2009; STANDARD METHODS, 2011).

O teste de toxicidade aguda com o microcrustáceo *Daphnia similis* é padronizado pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 12713, 2009); tem sido amplamente utilizado pela CETESB, para o controle de efluentes líquidos industriais, para a classificação e registro de novos produtos químicos e para o controle da qualidade das águas superficiais (BORRELY, 2001; ABNT, 2009).

O teste baseia-se na exposição de organismos jovens (6 - 24 horas) a diferentes concentrações da substância-teste, conforme condições estabelecidas na padronização do teste. O efeito observado no final de um período de 24 ou 48 horas de exposição é a imobilidade ou a letalidade dos organismos. A imobilidade é “a condição na qual o organismo não pode se movimentar na água por ele mesmo, apesar de poder apresentar batimentos cardíacos”. E letalidade nada mais é do que a morte dos organismos, ou seja, não há indícios de batimentos cardíacos (CETESB, 1986; TAVARES, 2014; ABNT, 2009).

3.13 *Ceriodaphnia dubia*

Ceriodaphnia dubia (Figura 5) é um microcrustáceo zooplancônico de água doce, facilmente encontrado em lagos e represas, que atua como consumidor primário na cadeia alimentar aquática por ser uma fonte de alimento para anfíbios, peixes e outras espécies aquáticas, e se alimenta por filtração de material orgânico particulado (ABNT, 2010; LAVORGNA et al., 2016).

Figura 5. A- *Ceriodaphnia dubia*; B- “garra”; C- “pós-abdômen” (STANDARD METHODS, 2011).

Taxonomicamente, *Ceriodaphnia* spp. lembra *Daphnia* spp., porém, menor (de 0,8 mm a 0,9 mm de comprimento, de corpo ovalado e com 8 a 10 espinhos anais), e apresenta tempo de reprodução mais rápido (produzem de três a quatro crias por semana) em condições ideais, enquanto *Daphnia* spp., por causa de seu tamanho maior, não se reproduz até a 4ª - 6ª fase após a eclosão (ABNT, 2010; STANDARD METHODS, 2011).

O gênero *Ceriodaphnia* spp. tem sido utilizado em testes para avaliar a toxicidade crônica de substâncias químicas puras, misturas complexas e de águas superficiais. Estes organismos, assim como a *Daphnia* spp., são popularmente conhecidos como “pulgas d’água” e se reproduzem assexuadamente por partenogênese, originando uma população constituída apenas por fêmeas, geneticamente idênticas à mãe (ABNT, 2010; SHARMA; LANGER; NOORANI, 2016).

O ciclo de vida (duração média de 50 dias a 20°C e de 30 dias a 25 °C) é dependente da temperatura e também de outras condições ambientais. Sendo assim, quando as condições ambientais tornam-se desfavoráveis, ou seja, aumento exagerado da população, ausência de alimento e alterações de temperatura, surge nas culturas os machos e as fêmeas com óvulos constituídos de células haploides (ABNT, 2010; CAMARGO, 2012).

O teste de toxicidade crônica com o microcrustáceo *Ceriodaphnia dubia* é padronizado pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 13373, 2010), e também tem sido bastante utilizado pela CETESB para o controle de águas superficiais e efluentes líquidos, avaliando os riscos ambientais (STRUEWING et al., 2015). Os testes crônicos permitem avaliar, com base no desenvolvimento e reprodução dos organismos, os possíveis efeitos adversos de determinada amostra sob longo tempo de exposição a diferentes concentrações. O efeito tóxico crônico define-se como “efeito deletério aos organismos vivos, causado por agentes físicos ou químicos, que afetam uma ou várias funções biológicas dos organismos, tais como a reprodução, o crescimento e o comportamento, em um período de exposição que pode

abranger a totalidade de seu ciclo de vida ou parte dele” (RAND, 1995; ABNT, 2010; CAMARGO, 2012).

3.14 *Vibrio fischeri*

Vibrio fischeri (Figura 6) é uma enterobactéria, Gram negativa, pertencente à família Vibrionaceae, uma grande família consistindo em muitas espécies, que são caracterizadas pela cooperação e interação com tecidos de outros animais (HARMEL, 2004). *Vibrio fischeri* são bactérias que vivem no intestino e em órgãos luminosos de lulas (*Euprymna scolopes*), peixes e outros animais marinhos, estabelecendo uma relação de simbiose importante para ambas as espécies (CAETANO; ANTUNES, 2003).

Figura 6. Bactéria marinha luminescente *Vibrio fischeri*. Fonte: Google.

A bioluminescência produzida pela bactéria marinha *Vibrio fischeri* é a base para vários bioensaios de toxicidade em diferentes matrizes ambientais, tais como: água superficial, sedimentos, água contaminada, água pluvial, água subterrânea, entre outras. Em todos esses sistemas a toxicidade é avaliada medindo até que ponto a substância causa inibição sobre a emissão de luz pelas bactérias (MAGALHÃES; FERRÃO-FILHO, 2008).

A bioluminescência é um complexo fenômeno regulado na bactéria *Vibrio fischeri* (MA et al., 2014). A emissão de luz nas bactérias é influenciada pelo fenômeno chamado de “quorum sensing”, que se traduz em um sinal de concentração celular. Muitas bactérias são capazes de

monitorar suas densidades populacionais com a reação de bioluminescência, mediada pela enzima luciferase, que resulta da oxidação de uma riboflavina 5-fosfato e um aldeído de longa cadeia na presença de oxigênio (PAPENFORT; BASSLER, 2016).

A inibição das enzimas envolvidas nesse processo irá causar uma diminuição na produção da luz emitida pelas bactérias. Assim, a emissão de luz é o resultado do processo total da célula, ou seja, é a expressão da resultante de uma série complexa de reações bioquímicas produtoras de energia (COSTA et al., 2015). A medida da quantidade de luz emitida por essas suspensões bacterianas antes e após o contato com a amostra, em intervalos de tempo padronizados, mostra claramente a redução da capacidade de produção da luz pela bactéria ao entrar em contato com as substâncias tóxicas (MA et al., 2014).

O teste de toxicidade aguda com a bactéria luminescente *Vibrio fischeri* é padronizado pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 15411-3, 2012) e vem sendo utilizado, mais recentemente, na avaliação da qualidade das águas superficiais (ABNT, 2012). O ensaio que utiliza a bactéria *Vibrio fischeri* é amplamente aplicado no monitoramento de substâncias tóxicas ambientais em muitos países e no Brasil.

No campo aquático, um dos bioensaios toxicológicos mais difundidos é o ensaio de bioluminescência de *Vibrio fischeri*, devido à sua fácil interpretação e boa relação velocidade/custo quando comparado com outros testes. Além disso, este ensaio bioluminescente exibe excelente correlação com os bioensaios realizados em organismos superiores, como algas, crustáceos e peixes (COSTA et al., 2015).

Levando em consideração o fato de os ecossistemas aquáticos serem os principais receptáculos de contaminantes, nota-se a necessidade em estudar os processos biológicos e conhecer suas consequências para a saúde pública, utilizando o monitoramento ambiental como ferramenta de gestão, com o intuito de fornecer informações a respeito da extensão dos impactos causados pela poluição como forma de controlar a degradação dos recursos hídricos.

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local de estudo e pontos de amostragem

O local de estudo é o Rio Pardo, o qual possui nascentes no Planalto Sul de Minas (nasce na Serra de Ipuíúna, município de Ipuíúna, MG) e que se dirige para o rio Grande, acompanhando a inclinação do relevo. Ele é o maior afluente do rio Grande pela margem esquerda, ao qual se lança após um curso de cerca de 550 km. Apesar de nascer em Minas Gerais, 84% do seu curso desenvolve-se no Estado de São Paulo. Seu maior afluente é o rio Mogi-Guaçu, que também nasce em território mineiro. Os principais cursos d'água integrantes da bacia, além do Rio Pardo, são os rios Canoas (que nasce em MG) e Araraquara, e os ribeirões São Pedro, da Floresta e da Prata, pela margem direita, e os rios Tambaú, Verde e da Fartura e o Ribeirão Tamanduá, pela margem esquerda (CBH-PARDO, 2014).

Abrangendo 27 municípios, a Bacia Hidrográfica do Rio Pardo (UGRHI 04) constitui importante contingente populacional (SIGRH, 2017). A principal prática agrícola da região baseia-se na cultura da cana-de-açúcar, destinada à produção de etanol e açúcar, principalmente para o mercado externo (ARAÚJO et al., 2011).

Considerando a viabilidade econômica para a condução das análises, para o presente estudo foram selecionados 6 pontos de amostragem no Rio Pardo (Tabela 1; Figura 7); dentre eles, quatro pontos são rotineiramente monitorados pela CETESB (pontos 1, 2, 4 e 5). O ponto 3 corresponde ao local previsto para ser o ponto de captação de água para abastecimento suplementar do município de Ribeirão Preto - SP, segundo informações obtidas na Resolução nº 1.021, de 6 de agosto de 2013 (ANA, 2013); e a foz do Rio Pardo, encontro com Rio Grande, corresponde ao ponto 6.

Tabela 1 - Pontos de amostragem de dados no Rio Pardo, municípios próximos aos pontos e localização geográfica.

Ponto	Municípios	Latitude	Longitude	Possíveis fontes de poluição
1	S. J. do Rio Pardo, Caconde, SP	S21° 34' 18.7''	W46° 50' 07.9''	Curtume (GEMG, 2014), fábrica de condutores elétricos (GEMG, 2013) e de fundições metálicas (GEMG, 2011)
2	Mococa, Casa Branca, SP	S21° 37' 22.7''	W47° 02' 34.8''	Indústria química, mineradora, indústria de couro e derivados do leite (DOSP, 2011)
3	Ribeirão Preto, SP (captação)	S21° 07' 56.3''	W47° 41' 26.1''	Usina de açúcar e álcool (DOSP, 1969), plantações de cana-de-açúcar
4	Ribeirão Preto, SP (clubes)	S21° 06' 12.2''	W47° 45' 27.3''	ETE do município de Ribeirão Preto (DOSP, 2012)
5	Pontal/Cândia, SP	S20° 57' 57.6''	W48° 01' 35.4''	Usinas de açúcar e álcool (DOSP, 1978), plantações de cana-de-açúcar
6	Colômbia, SP (fz)	S20° 10' 22.8''	W48° 38' 27.3''	Indústrias de açúcar e álcool (DOSP, 2015), plantações de cana-de-açúcar

O mapa representativo dos pontos de amostragem no Rio Pardo e a vista parcial dos pontos, onde foram realizadas as coletas de amostras de água, é apresentado na Figura 7.

Figura 7. Mapa representativo dos pontos de amostragem no Rio Pardo e vista parcial dos pontos de amostragem no Rio Pardo (MACHADO, 2016).

4.2 Campanhas de amostragem

Foram realizadas duas campanhas de coleta de amostras de água superficial para avaliação ecotoxicológica, sendo a primeira na estação chuvosa (fevereiro/2016), com média mensal pluviométrica de 214,4 mm, e a segunda na estação seca (agosto/2016), período considerado de estiagem, no qual registrou-se 17,0 mm de chuva média mensal. Na Figura 8, é apresentado o perfil de chuvas mensal da região de Ribeirão Preto, construído a partir da média histórica dos valores pluviométricos de 1º de janeiro de 2006 a 31 de dezembro de 2016, que caracterizam as estações chuvosa e seca na região (CIIAGRO, 2017).

Figura 8. Perfil pluviométrico mensal de Ribeirão Preto - SP, valor médio obtido no período de 1º de janeiro de 2006 a 31 de dezembro de 2016 (CIIAGRO, 2017).

4.3 Análise de parâmetros físico-químicos

As leituras de Oxigênio Dissolvido (OD), pH e Temperatura foram verificadas no momento da realização dos ensaios na Divisão de Laboratório de Ribeirão Preto, SP - CETESB. As leituras de OD foram aferidas utilizando um oxímetro da marca WTW OXI 197. Para o pH as leituras foram realizadas com um pHmetro da marca Thermoscientific Orion 4 Star e a

Temperatura da água foi controlada em estufa e verificada utilizando um termômetro de vidro da marca Incoterm (de -10° a 50°C).

4.4 Amostragem

4.4.1 *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia dubia*

A amostragem foi realizada em frascos descartáveis de plástico, de 1500 mL, totalmente preenchidos com a amostra de maneira a evitar a presença de ar nos mesmos. Como não foi possível iniciar o ensaio em até 48 horas após a coleta, as amostras foram congeladas a - 10°C por até 60 dias. As amostras congeladas foram retiradas do congelador no dia anterior ao teste e deixadas à temperatura ambiente. Após o descongelamento, as amostras foram analisadas em até 12 horas, não podendo ser congeladas novamente (ABNT, 2007; ABNT, 2009; ABNT, 2010).

4.4.2 *Vibrio fischeri*

A amostragem foi realizada em frascos descartáveis de polietileno, de 50 mL, limpos e quimicamente inertes. Os frascos foram devidamente preenchidos com a amostra, vedados e congelados a -10°C. As amostras foram retiradas do congelador no dia anterior ao teste e deixadas à temperatura ambiente, garantindo que as mesmas estivessem descongeladas no momento do teste (ABNT, 2007; ABNT, 2012).

4.5 Ensaios ecotoxicológicos

4.5.1 *Daphnia similis*

Os organismos de *Daphnia similis* utilizados no ensaio de toxicidade foram cultivados na Divisão de Laboratório de Ribeirão Preto, SP - CETESB, seguindo metodologia padronizada pela ABNT NBR 12713-2009.

4.5.1.1 Meio de cultivo de *Daphnia similis*

Para o cultivo dos organismos, preparou-se o Meio MS (ou água reconstituída), adicionando-se quantidades específicas de reagentes de grau analítico em água ultrapura, provenientes de sistema MilliQ.

4.5.1.2 Soluções utilizadas

- Água de cultivo e diluição - Meio MS (KEATING, 1985)

Esse meio foi preparado adicionando-se para cada litro de água ultrapura 5,00 mL das soluções estoque 1 e 2; 4,00 mL da solução estoque 4 e 1,00 mL das soluções estoque 3, 5, 6 e 7.

- ✓ Solução estoque 1:

10,00 g de nitrato de sódio (NaNO_3), 1,7183 g de silicato de sódio (Na_2SiO_3), 1,8125 g de fosfato monobásico de potássio (KH_2PO_4) e 2,00 g de fosfato dibásico de potássio (K_2HPO_4) foram dissolvidos em 1.000 mL de água ultrapura. A solução foi mantida ao abrigo da luz por até 3 meses.

- ✓ Solução estoque 2:

2,00 g de cloreto de potássio (KCl) e 5,1455 g de sulfato de magnésio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) foram dissolvidos em 1.000 mL de água ultrapura. A solução foi mantida ao abrigo da luz por até 3 meses.

- ✓ Solução estoque 3:

24,4769 g de cloreto de cálcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) foram dissolvidos em 500,00 mL de água ultrapura. A solução foi mantida ao abrigo da luz por até 3 meses.

- ✓ Solução estoque 4:

2,50 g de EDTA; 2,80 g ácido bórico (H_3BO_3), 0,5803 g de cloreto de ferro anidro (FeCl_3); 0,36 g de cloreto de manganês tetrahidratado ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$); 0,3035 g de cloreto de lítio (LiCl); 0,071 g de cloreto de rubídio (RbCl); 0,1517 g de cloreto de estrôncio hexahidratado

($\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$); 0,0321 g de brometo de sódio (NaBr); 0,063 g de molibdato de sódio dihidratado ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$); 0,0336 g de cloreto de cobre dihidratado ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$); 0,026 g de cloreto de zinco (ZnCl_2); 0,0101 g de cloreto de cobalto hexahidratado ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) e 0,0033 g de iodeto de potássio (KI) foram dissolvidos em 2.000 mL de água ultrapura. A solução foi armazenada em frasco âmbar por até 1 mês a 4 °C.

✓ Solução estoque 5:

0,0014 g de dióxido de selênio (SeO_2) foi dissolvido em 1.000 mL de água ultrapura. A solução foi mantida por até 1 mês a 4 °C.

✓ Solução estoque 6:

0,0011 g metavanadato de amônio (NH_4VO_3) foi dissolvido em 1.000 mL de água ultrapura. A solução foi mantida a 4 °C por até 1 ano.

✓ Solução estoque 7:

0,0010 g de cianocobalamina (Vitamina B12) foi dissolvido em 1.000 mL de água ultrapura. A solução foi congelada por até 15 dias e descongelada apenas no momento de preparo do Meio MS.

O Meio MS foi aerado por 24 horas após o preparo para homogeneização. Em seguida, o pH e dureza foram mensurados, sendo que os mesmos deveriam seguir o padrão abaixo:

- pH: entre 7,00 e 7,60.
- Dureza: entre 40 e 48 mg CaCO_3/L .

Depois do período de 24 horas de aeração, a viabilidade de meio de cultivo MS foi avaliada, expondo neonatos ao meio por 48 horas, sem alimento e iluminação. A água de cultivo foi utilizada quando a imobilidade nos organismos não excedeu 10%.

4.5.1.3 Manutenção de *Daphnia similis*

Os organismos teste foram obtidos de uma cultura de *Daphnia similis* do laboratório da CETESB de Ribeirão Preto. Eles foram cultivados em Meio MS, alimentados diariamente com $3,2 \times 10^6$ células da alga *Pseudokirchneriella subcapita* e 0,02 mL de solução de ração para peixe Tetramin por *Daphnia*/dia. Os organismos de *Daphnia similis* (Figura 9) foram mantidos em lotes de até 25 adultos por litro, sendo recipientes de 1000 mL a 2000 mL, com luminosidade difusa, foto período de 16 h de luz e 8 h de escuridão, sob a temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$. A troca do meio de cultivo foi realizada duas vezes por semana e as culturas foram mantidas no laboratório até a idade de 28 dias.

Figura 9. Cultivo de organismos de *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia dubia*.

4.5.1.4 Teste de sensibilidade de *Daphnia similis* ao Cloreto de Potássio

A sensibilidade das culturas de *Daphnia similis* foi avaliada mensalmente, de janeiro a dezembro de 2016, com Cloreto de Potássio (KCl), empregando neonatos. Nesse ensaio, os organismos foram expostos ao sal nas concentrações estabelecidas pela CETESB de 370; 480; 620; 800 e 1000 mg/L, e um controle negativo, Meio MS. Cada concentração foi testada em quadruplicata com 5 organismos em cada frasco. Os testes foram incubados por 48 horas, sem iluminação e alimento. Após a fase de exposição, os indivíduos foram avaliados visualmente

quanto à sua mobilidade e foram contabilizados os organismos imóveis, ou seja, incapazes de nadar após leve agitação da amostra.

O KCl foi selecionado como substância de referência devido ao seu baixo risco à saúde humana e ao ambiente - comparado com outras substâncias de referência, como dicromato de potássio -, sendo essa substância facilmente absorvida pela pele, com potencial carcinogênico e mutagênico e perigoso para o ambiente (ABNT, 2009; ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

4.5.1.5 Ensaio de toxicidade aguda de água superficial com *Daphnia similis*

O ensaio de toxicidade aguda de água superficial com *Daphnia similis* foi realizado em duas etapas: a primeira entre os dias 17 e 19 de fevereiro de 2016 (estação chuvosa) e a segunda de 19 a 21 de setembro de 2016 (estação seca), na Divisão de Laboratório de Ribeirão Preto, SP - CETESB, seguindo metodologia padronizada pela ABNT NBR 12713-2009.

Organismos jovens de *Daphnia similis* (com idade aproximada de 6 a 24 horas, obtidos provenientes de fêmeas com idade entre 7 e 28 dias, a partir da segunda postura) foram expostos a amostras de água superficial por um período de 48 horas.

Após o período de exposição, o teste foi realizado avaliando o parâmetro mortalidade/imobilidade e os resultados obtidos foram expressos em Tóxico (T) e Não Tóxico (NT), utilizando o software TOXSTAT 3.5. Segundo esta mesma norma, a NBR 12713-2009, para amostra na qual se pretende o resultado qualitativo, não foram necessárias diluições.

4.5.2 *Ceriodaphnia dubia*

Os organismos de *Ceriodaphnia dubia* utilizados nos ensaios de toxicidade foram cultivados na Divisão de Laboratório de Ribeirão Preto, SP - CETESB, seguindo metodologia padronizada pela ABNT NBR 13373-2010.

4.1.1.1 Meio de cultivo de *Ceriodaphnia dubia*

O meio de cultivo adotado para *Ceriodaphnia dubia* foi água natural coletada em Cachoeira de Emas, SP, Brasil (21°55'36" de latitude sul e 47°22'15" de longitude oeste), conforme estabelecido pela CETESB de Ribeirão Preto. Após a coleta, a água foi filtrada em rede de plâncton e os parâmetros pH e dureza foram ajustados, sendo que esses parâmetros finais deveriam estar compreendidos entre 7,00 e 7,60 (pH) e 40 e 48 mg CaCO₃/L (dureza). A viabilidade do meio de cultivo também foi avaliada como descrito anteriormente para *Daphnia similis*.

4.5.2.2 Manutenção da *Ceriodaphnia dubia*

Os organismos-teste foram obtidos de uma cultura de *Ceriodaphnia dubia* (Figura 9) do laboratório da CETESB de Ribeirão Preto. Eles foram cultivados individualmente em água natural, mantidos isolados em recipientes com aproximadamente 15 mL de água de diluição e alimentados com cerca de 0,1 mL (2 gotas) de suspensão algácea de *Pseudokirchneriella subcapitata*, com uma concentração de 3,0 a 3,5x10⁷ células/mL e com cerca de 0,05 mL (1 gota) de ração Tetramin por *Ceriodaphnia*/dia.

As culturas foram mantidas em ambiente com luminosidade difusa, foto período de 16 h de luz e 8 h de escuridão e a temperatura da água foi preservada em 25±2°C. A água de cultivo foi renovada três vezes na semana e as culturas foram mantidas no laboratório até a idade de 21 dias.

4.5.2.3 Teste de sensibilidade de *Ceriodaphnia dubia* ao Cloreto de Sódio

Mensalmente, de janeiro a dezembro de 2016, a sensibilidade dos organismos foi avaliada empregando-se Cloreto de Sódio (NaCl) como substância de referência. Nesse ensaio, os neonatos foram expostos ao sal nas concentrações de 250; 500; 1000 e 2000 mg/L e à água

natural de cultivo (controle negativo). Para cada concentração foram preparadas 10 replicatas com um indivíduo em cada frasco, mantidos em incubadoras por sete dias, com fotoperíodo (16 horas de luz e 8 horas de escuro) e temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$.

A renovação da solução teste foi realizada a cada 2 dias e os organismos foram alimentados diariamente. Durante a renovação da solução teste, o número de neonatos produzidos e de organismos mortos foram contabilizados. Os testes foram considerados válidos quando a mortalidade dos organismos adultos no controle não excedeu 20%, e quando 60%, ou mais, das fêmeas adultas do controle negativo produziram, no mínimo, 15 neonatos até o oitavo dia (ABNT, 2010).

4.5.2.4 Ensaio de toxicidade crônica de água superficial com *Ceriodaphnia dubia*

O ensaio de toxicidade crônica de água superficial com *Ceriodaphnia dubia* foi realizado entre os dias 17 e 24 de fevereiro de 2016, na estação chuvosa, e de 19 a 26 de setembro de 2016 (estação seca), na Divisão de Laboratório de Ribeirão Preto, SP - CETESB, seguindo metodologia padronizada pela ABNT NBR 13373-2010.

Organismos jovens do gênero *Ceriodaphnia dubia* (com idade aproximada de 6 a 24 horas, obtidos a partir de fêmeas com idade entre 7 e 21 dias de idade) foram expostos a amostras de água superficial por um período de 7 dias.

No ensaio de toxicidade crônica com *Ceriodaphnia dubia* foram analisados 70 organismos em cada uma das estações do ano. Os organismos foram mantidos individualmente em béqueres de 15 mL, alimentados diariamente, e contabilizou-se o número de filhotes que foram produzidos no 3º, no 5º e no 7º dia. Esses dados foram lançados no programa TOXSTAT 3.5, que apresentou o número médio de neonatos produzidos por adulta no controle (C) e em cada uma das 6 amostras. Com isso, o programa TOXSTAT 3.5, por meio de teste estatístico,

indicou quais amostras apresentaram diferenças estatisticamente significantes em relação ao controle.

Os testes foram realizados durante um período de 7 dias de exposição e os resultados obtidos foram expressos em Efeito Agudo (EA), Efeito Crônico (EC) e Não Tóxico (NT). Segundo esta mesma norma, a ABNT NBR 13373-2010, para amostra na qual se pretende o resultado qualitativo, não foram necessárias diluições.

4.5.3 *Vibrio fischeri*

O ensaio de toxicidade aguda de água superficial com *Vibrio fischeri* foi realizado em 25 de fevereiro de 2016 (estação chuvosa) e no dia 25 de outubro de 2016 (estação seca), na Divisão de Laboratório de Ribeirão Preto, SP - CETESB, seguindo metodologia padronizada pela ABNT NBR 15411-2012 - Parte 3.

4.5.3.1 Soluções utilizadas

As soluções utilizadas foram: Solução de Sulfato de Zinco Heptahidratado ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (0,01%), armazenado em geladeira por até 4 meses; Diluente Microtox (Solução de NaCl 2%), mantida em refrigerador (2 a 8 °C) por até 1 ano; Solução de Ajuste Osmótico (SAO 2,2 %), mantida em refrigerador (2 a 8 °C) por até 1 ano; e a Solução de Reconstituição utilizada para reconstituição da bactéria foi fornecida pela empresa Azur Environmental, USA, com certificado de qualidade.

4.5.3.2 Organismo teste

Para o ensaio, utilizou-se uma cultura liofilizada da bactéria marinha bioluminescente *Vibrio fischeri*, contendo 10^8 células por ampola, estocadas em freezer (entre -25 e -20 °C).

4.5.3.3 Teste de sensibilidade de *Vibrio fischeri* ao Sulfato de Zinco

Os ensaios de sensibilidade com o ZnSO_4 e, posteriormente, com as amostras, foram realizados em 25 de fevereiro e 25 de outubro de 2016, com o equipamento Analisador de Toxicidade Sistema Microtox Modelo 500, Software Microtox Omni (Azur Environmental, USA).

Inicialmente, foram realizadas diluições seriadas com a solução estoque de ZnSO_4 (100 mg/L), resultando em sete diluições. A bactéria foi ressuspensa com a solução de reconstituição e a luminescência foi mensurada antes e após 15 minutos de contato entre o organismo e as diluições do sal. Os resultados foram expressos em CE50 (Concentração Efetiva da amostra capaz de reduzir 50% da luminescência dos organismos expostos).

4.5.3.4 Ensaio de toxicidade aguda de água superficial com *Vibrio fischeri*

Este ensaio baseia-se na medida da intensidade de luz emitida pela bactéria marinha *Vibrio fischeri*, na presença e ausência da amostra em teste. Nesta bactéria, a emissão de luz visível ocorre através de um processo enzimático. A inibição de qualquer das inúmeras enzimas envolvidas neste processo irá causar diminuição da intensidade de luz emitida.

O decréscimo da intensidade de luz emitida nas diferentes concentrações foi calculado e determinado a CE50 (para a análise do controle positivo com $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e CE20 (para análise das amostras).

O ensaio foi realizado com o sistema MICROTOX®, modelo 500 (Figura 10). O equipamento é composto por um fotômetro de precisão; câmaras de incubação e reação, que permanecem a 15°C; e uma câmara de pré-resfriamento, a 3°C. Em todos estes compartimentos, foram utilizadas cubetas de borossilicato, permitindo a leitura da luminescência.

Figura 10. Sistema MICROTOX®, modelo 500.

As bactérias utilizadas nos ensaios são liofilizadas, da marca “Acute Reagent, Microtox - Modern Water”, armazenadas em um freezer a -20°C . Para a realização do ensaio, as bactérias foram reidratadas com $1000\ \mu\text{L}$ de uma solução diluente e mantidas na câmara de pré-resfriamento. Após a reidratação, todas as amostras tiveram reajuste osmótico, com volume de $100\mu\text{L}$ da solução de ajuste e, assim, as amostras ficaram prontas para o uso. Para as amostras procedentes do Rio Pardo, foi feito ajuste osmótico com $0,2\ \text{mL}$ de solução salina de NaCl 20%.

Os ensaios foram realizados com um controle e com as amostras na concentração de 81,90%, primeira série de cubetas. Numa segunda série de cubetas, foram colocadas as soluções reagentes, que continham $100\ \mu\text{L}$ de bactéria. Foi realizada a leitura inicial da luminescência (I0), das soluções que tiverem somente a bactéria. Em seguida foram transferidos $900\ \mu\text{L}$ das amostras para as cubetas contendo a bactéria. Transcorridos os 5 e 15 minutos de exposição da bactéria, foram realizadas as demais leituras (I5) e (I15).

4.6 Carta Controle

Um grupo de mais de 20 ensaios com a substância de referência deve compor a carta controle, sendo que os ensaios de sensibilidade devem ser realizados conforme as condições do ensaio definitivo.

Segundo as normas da ABNT NBR 12713-2009 e NBR 13373-2010, na inexistência de 20 resultados de ensaio, deve ser calculada a média provisória, com no mínimo cinco resultados, até que se completem os 20 resultados e se obtenha a média definitiva. Após 20 resultados de ensaio de ecotoxicidade, com substância de referência, calcula-se o valor médio ($\bar{X}$), o desvio-padrão (σ) e o coeficiente de variação (CV).

O valor obtido no ensaio de sensibilidade deve estar compreendido em um intervalo de ± 2 desvios-padrão em relação aos valores médios anteriormente obtidos para a mesma espécie.

Todos os procedimentos relacionados ao ensaio devem ser reavaliados quando: dois resultados consecutivos estiverem além dos limites definidos na carta-controle ou sete resultados consecutivos estiverem de um mesmo lado da linha de tendência central.

4.7 Análise estatística

Para o ensaio de toxicidade aguda com *Daphnia similis*, os resultados foram analisados no programa TOXSTAT 3.5 (WEST INC; GULLEY, 1995), por meio de testes estatísticos ANOVA ($p < 0,05$) e Bonferroni ($p < 0,10$). No ensaio de sensibilidade, a concentração efetiva que causou imobilidade em 50% dos organismos expostos, CE50 48 h, foi calculada através do método estatístico Trimmed Spearman – Karber, com um intervalo de confiança de 95%, e os resultados foram expressos em mg/L (HAMILTON; RUSSO; THURSTON, 1977).

No ensaio de toxicidade crônica com *Ceriodaphnia dubia*, os resultados foram analisados no programa TOXSTAT 3.5 (WEST INC; GULLEY, 1995), por meio de testes estatísticos ANOVA ($p < 0,05$) e Bonferroni ($p < 0,10$). No ensaio de sensibilidade, os resultados foram avaliados pelo método de interpolação linear, empregando o programa ICPIN (NORBERG-KING, 1993) para determinar a concentração capaz de inibir 50% (CI₅₀) da reprodução nos organismos expostos por 7 dias.

Os dados obtidos no ensaio de toxicidade aguda com *Vibrio fischeri* foram analisados no software Microtox Omni e os resultados foram expressos em % de inibição da luminescência para as amostras analisadas e em Concentração Efetiva, que causa 50% de inibição da luminescência após quinze minutos de exposição (CE50 15'), para o Sulfato de Zinco.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

Nesta seção, serão apresentados os resultados obtidos nos testes de sensibilidade desenvolvidos para *Daphnia similis*, *Ceriodaphnia dubia* e *Vibrio fischeri*, bem como os resultados obtidos nos ensaios de toxicidade com os organismos.

5.1. Sensibilidade de *Daphnia similis* ao Cloreto de Potássio

A sensibilidade de *Daphnia similis* ao Cloreto de Potássio (KCl) foi avaliada mensalmente durante o ano de 2016. As concentrações de KCl que causaram imobilidade em 50% dos organismos expostos (CE50) durante esse período estão representadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Concentração de Cloreto de Potássio (KCl), para CE50 48h, dos organismos (*Daphnia similis*) expostos no período de janeiro a dezembro de 2016.

Teste	Cloreto de Potássio (KCl)	
	CE50 48 h (mg/L)	Intervalo de confiança (95%)
Janeiro	803,86	765,66 – 842,06
Fevereiro	677,70	639,50 – 715,90
Março	670,81	632,61 – 709,01
Abril	738,76	700,56 – 776,96
Maio	652,05	613,85 – 690,25
Julho	880,03	841,83 – 918,23
Agosto	729,98	691,78 – 768,18
Setembro	720,72	682,52 – 758,92
Outubro	729,38	691,18 – 767,58
Novembro	725,63	687,43 – 763,83
Dezembro	693,53	655,33 – 731,73
Média ± Desvio Padrão: 729,31 ± 64,64		
Faixa de Sensibilidade (mg/L): 613,85 – 918,23		

Os meses de fevereiro (677,70 mg/L) e setembro (720,72 mg/L) de 2016 representam o período de realização dos testes de toxicidade aguda com *Daphnia similis*. Esses valores de CE50 48 h estavam compreendidos num intervalo de ± 2 desvios padrão em relação aos valores médios da carta controle obtidos para a mesma espécie em testes realizados pela CETESB nos

demaís meses do ano. Logo, a sensibilidade dos organismos estava dentro da faixa de aceitação para a realização dos bioensaios.

5.2 Sensibilidade de *Ceriodaphnia dubia* ao Cloreto de Sódio

A sensibilidade dos organismos foi mensurada durante o ano de 2016 e a concentração de Cloreto de Sódio que causou redução de 50% na reprodução dos organismos após sete dias de exposição está apresentada na Tabela 3.

Tabela 3: Concentração de Cloreto de Sódio (NaCl), para CE50 7 dias, dos organismos (*Ceriodaphnia dubia*) expostos no período de janeiro a dezembro de 2016.

Cloreto de Sódio (NaCl)		
Teste	CE50 7 dias (mg/L)	Intervalo de confiança (95%)
Janeiro	1171,99	1052,03 – 1291,95
Fevereiro	526,32	406,36 – 646,28
Março	1048,78	928,82 – 1168,74
Abril	1065,93	945,97 – 1185,89
Maio	1071,08	951,12 – 1191,04
Julho	1182,29	1062,33 – 1302,25
Agosto	689,47	569,51 – 809,43
Setembro	842,47	722,51 – 962,43
Outubro	908,48	788,52 – 1028,44
Novembro	823,33	703,37 – 943,29
Dezembro	445,31	325,35 – 565,27
Média ± Desvio Padrão: 888,68 ± 203,00		
Faixa de Sensibilidade (mg/L): 325,35 – 1302,25		

Os meses de fevereiro (526,32 mg/L) e setembro (842,47 mg/L) de 2016 representam o período de realização dos testes de toxicidade crônica com *Ceriodaphnia dubia*. Esses valores de CE50 7 dias estavam compreendidos num intervalo de ± 2 desvios padrão em relação aos valores médios da carta controle obtidos para a mesma espécie em testes realizados pela CETESB nos demais meses do ano. Logo, a sensibilidade dos organismos estava dentro da faixa de aceitação para a realização dos bioensaios.

5.3 Sensibilidade de *Vibrio fischeri* ao Sulfato de Zinco

O Sulfato de Zinco foi utilizado como substância de referência nos ensaios com *Vibrio fischeri*. Todos os valores obtidos no período dos ensaios apresentaram-se dentro da faixa de aceitação (3,00-10,00 mg/L) e a média da sensibilidade foi 5,486 mg/L (Tabela 4).

Tabela 4 - Valores de CE50 obtidos nos ensaios de sensibilidade com *Vibrio fischeri* após exposição ao Sulfato de Zinco por 15 minutos nos ensaios de sensibilidade realizados no ano de 2016.

Sulfato de Zinco (ZnSO ₄ .7H ₂ O)		
Teste	CE50 15' (mg/L)	Intervalo de confiança (95%)
25 de fevereiro/16	5,913	4,529 – 7,720
25 de outubro/16	5,059	3,629 – 7,052
Média ± Desvio Padrão: 5,486 ± 0,604		
Faixa de Sensibilidade (mg/L): 3,629 – 7,720		

Na Tabela 5 e Figura 11 estão apresentados os resultados obtidos através da correlação de efeito entre a concentração e a redução da luminescência, no teste de sensibilidade ao Sulfato de Zinco.

Tabela 5 - Correlação de efeito entre a concentração e a redução da luminescência, no teste de sensibilidade ao Sulfato de Zinco realizado no dia 25 fev/16.

Amostras	15 min:				
	Concentração	I0	It	Gama (Γ)	% efeito
Controle	0,000	96,00	73,00	0,7604	-
1	0,773	86,00	64,00	0,0218	2,134%
2	1,547	80,00	53,00	0,1478	12,88%
3	3,094	82,00	40,00	0,5589	35,85%
4	6,188	83,00	27,00	1,338	57,22%
5	12,38	83,00	16,00	2,945	74,65%
6	24,75	82,00	10,00	5,235	83,96%
7	49,50	87,00	6,00	10,03	90,93%

Figura 11. Correlação de efeito entre a concentração e a redução da luminescência, no dia 25 de fevereiro de 2016.

Na Tabela 6 e Figura 12 estão apresentados os resultados obtidos através da correlação de efeito entre a concentração e a redução da luminescência, no teste de sensibilidade ao Sulfato de Zinco.

Tabela 6 - Correlação de efeito entre a concentração e a redução da luminescência, no teste de sensibilidade ao Sulfato de Zinco realizado no dia 25 out/16.

Amostras	15 min:				
	Concentração	I0	It	Gama (Γ)	% efeito
Controle	0,000	92,00	75,00	0,8152	-
1	0,7734	79,00	61,00	0,0557	5,283 %
2	1,547	82,00	52,00	0,2855	22,21 %
3	3,094	83,00	38,00	0,7806	43,84 %
4	6,188	84,00	24,00	1,853	64,95 %
5	12,38	89,00	15,00	3,837	79,33 %
6	24,75	88,00	10,00	6,174	86,06 %
7	49,50	88,00	6,00	10,96	91,64 %

Figura 12. Correlação de efeito entre a concentração e a redução da luminescência, no dia 25 de outubro de 2016.

Observa-se, na Tabela 5 e Figura 11 (estação chuvosa) e na Tabela 6 e Figura 12 (estação seca), que a porcentagem de efeito sob a bactéria marinha aumentou à medida em que aumentavam-se as concentrações de Sulfato de Zinco nos testes de sensibilidade, ou seja, houve uma correlação de efeito entre a concentração e a redução da luminescência em ambas as estações.

Os resultados apresentados para os testes de sensibilidade, tanto para a *Daphnia similis*, quanto para a *Ceriodaphnia dubia* e *Vibrio fischeri*, mostraram que os organismos testes apresentam condições fisiológicas que os tornam aptos para serem utilizados nos ensaios de toxicidade que serão apresentados na sequência.

5.2 Ensaio de toxicidade

5.2.1 Ensaio de toxicidade aguda com *Daphnia similis*

Os resultados obtidos no ensaio de toxicidade aguda com *Daphnia similis*, realizado em duas etapas (Chuvosa e Seca), estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Resultados obtidos no ensaio de toxicidade aguda com *Daphnia similis*.

Nº da amostra	Nº total de organismos	Nº de organismos imóveis		% Imob. Obtidos		Toxicidade (T- Tóxico; NT- Não Tóxico)
		Chuvosa	Seca	Chuvosa	Seca	
C	50	0/50	1/50	0%	2%	NT
1	50	0/50	1/50	0%	2%	NT
2	50	0/50	2/50	0%	4%	NT
3	50	0/50	0/50	0%	0%	NT
4	50	2/50	0/50	4%	0%	NT
5	50	0/50	1/50	0%	2%	NT
6	50	1/50	1/50	2%	2%	NT

No ensaio de toxicidade aguda com *Daphnia similis* foram testados 350 organismos [50 no controle (C) e 50 em cada uma das 6 amostras] em cada estação do ano. Desses, apenas 3 organismos apresentaram-se imóveis na estação chuvosa, e 6 organismos na estação seca.

Para que as amostras fossem consideradas Tóxicas (T), seria necessário que, no mínimo, 20% dos organismos de cada amostra apresentassem imobilidade, ou seja, 10 organismos de um total de 50 (10/50). Portanto, todas as amostras foram classificadas como Não Tóxicas (NT).

5.2.2 Ensaio de toxicidade crônica com *Ceriodaphnia dubia*

Os resultados obtidos no ensaio de toxicidade crônica com *Ceriodaphnia dubia*, realizado em duas etapas (Chuvosa e Seca), estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 - Resultados obtidos no ensaio de toxicidade crônica com *Ceriodaphnia dubia*.

Nº da amostra	Nº médio de neonatos/adulta	Toxicidade (EA-Efeito Agudo; EC-Efeito Crônico; NT- Não Tóxico)	Nº médio de neonatos/adulta	Toxicidade (EA-Efeito Agudo; EC-Efeito Crônico; NT- Não Tóxico)
	Chuvosa		Seca	
C	22,5	NT	19,2	NT
1	20,2	NT	13,7	NT
2	21,2	NT	10,7	EC
3	21,5	NT	10,5	EC
4	23,0	NT	12,3	NT
5	18,8	NT	8,1	EC
6	21,3	NT	14,3	NT

Observa-se na Tabela 8 que, na estação chuvosa, nenhuma das amostras analisadas apresentou toxicidade, sendo classificadas como Não Tóxicas (NT). Dentre as amostras analisadas na estação seca, o programa TOXSTAT 3.5 apresentou diferença estatisticamente significativa entre o número médio de neonatos produzidos por adulta no controle (19,2) e nas amostras 2 (10,7), 3 (10,5) e 5 (8,1), sendo classificadas como Efeito Crônico (EC). No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa nas amostras 1 (13,7), 4 (12,3) e 6 (14,3), sendo também classificadas como Não Tóxicas (NT).

5.2.3 Comparação de dados institucionais com os dados obtidos no presente estudo

Os resultados obtidos nos ensaios de toxicidade crônica do presente estudo, utilizando o organismo *Ceriodaphnia dubia* nas estações chuvosa (fevereiro/16) e seca (agosto/16), foram comparados com os dados institucionais fornecidos pela CETESB nos mesmos meses de 2010 a 2015, sendo apresentados na Figura 13. Cabe destacar que os pontos 1, 2, 4 e 5 são os mesmos monitorados pela agência ambiental do Estado.

Figura 13. Comparação temporal dos ensaios de toxicidade crônica para *Ceriodaphnia dubia*, nas estações chuvosa e seca, no período 2010-2016. (Dados de 2010-2015 foram fornecidos pela CETESB e dados de 2016 foram obtidos no presente estudo).

No ponto 1, a classificação Não Tóxica (NT) pode ser observada em 57,14% dos testes realizados; o Efeito Crônico (EC) em 42,86%; e o Efeito Agudo (EA) não foi verificado em nenhum teste realizado no ponto 1, nos meses de fevereiro e agosto de 2010 a 2016. No ponto 2, as amostras que não apresentaram toxicidade representaram 57,14%, seguidas de EC com 35,72% e EA com 7,14% (somente na estação seca de 2012).

O ponto 4 destacou-se por ser o local onde foi observado maior quantidade de resultados não tóxicos (NT), representando 78,57% dos testes. O EC foi verificado somente nas estações secas dos anos de 2011 e 2014 (14,29%) e o EA, apenas na estação seca de 2012, com 7,14%. No ponto 5, assim como no ponto 1, não verificou-se nenhum caso de EA. Os resultados NT representaram 64,28% dos testes e o EC apareceu em 35,72% deles.

5.2.4 Ensaio de toxicidade aguda com *Vibrio fischeri*

Os resultados obtidos nos ensaios de toxicidade aguda com a bactéria marinha luminescente *Vibrio fischeri* podem ser observados nas Tabelas 10 e 11. Ensaio realizado previamente (dados não apresentados) indicaram que o efeito na perda da luminescência ocorria somente na maior concentração (81,9%). Por esta razão, as amostras foram testadas sem diluições, não sendo possível calcular a CE50 (5 e 15 min).

Assim, os resultados para este ensaio foram expressos em valores de gama (Γ), que é o resultado da razão entre a luminescência perdida e a luminescência remanescente. Portanto, o valor de gama, quanto mais próximo de 1, aproxima-se da concentração capaz de inibir 50% da emissão de luz (CE50). Cabe ressaltar ainda que, neste estudo, foram considerados indícios de toxicidade valores de gama acima de 0,2 (Wang *et al.*, 2002), já que não foi possível calcular a CE50.

5.2.4.1 Estação chuvosa

Na Tabela 9, está apresentada a luminescência emitida pela bactéria marinha *Vibrio fischeri*, antes de entrar em contato com as amostras (0 min), após 5 e 15 minutos de exposição, na estação chuvosa.

Tabela 9 - Luminescência emitida pela bactéria marinha *Vibrio fischeri*, antes de entrar em contato com as amostras (0 min), após 5 e 15 minutos de exposição, na estação chuvosa.

Tempo (min)	C	1	2	3	4	5	6
0	93	91	90	87	88	88	90
5	105	109	111	111	112	116	111
15	116	119	119	117	120	126	125

Na Tabela 10 e Figura 14, estão apresentados os resultados obtidos através da correlação de efeito entre a concentração e a redução da luminescência, no teste de toxicidade aguda com a bactéria marinha *Vibrio fischeri* realizado na estação chuvosa.

Tabela 10 - Correlação de efeito entre a concentração e a redução da luminescência, na estação chuvosa.

Amostras	5 min:			15 min:	
	Concentração	Gama (Γ)	% efeito	Gama (Γ)	% efeito
1	81,90	-0.0574	-6.091 %	-0.0461	-4.841 %
2	81,90	-0.0845	-9.238 %	-0.0566	-6.006 %
3	81,90	-0.1151	-13.00 %	-0.0725	-7.818 %
4	81,90	-0.1129	-12.73 %	-0.0853	-9.326 %
5	81,90	-0.1435	-16.75 %	-0.1289	-14.79 %
6	81,90	-0.0845	-9.238 %	-0.1019	-11.35 %

Figura 14. Correlação de efeito entre a concentração e a redução da luminescência, na estação chuvosa.

Observa-se, nas Tabelas 9 e 10 e Figura 14, que a luminescência emitida pela bactéria marinha aumentou na estação chuvosa após entrar em contato com as amostras por períodos de 5 e 15 minutos de exposição, ou seja, não foi observada inibição da luminescência e sim promoção desta.

5.2.4.2 Estação seca

Na Tabela 11, está apresentada a luminescência emitida pela bactéria marinha *Vibrio fischeri* antes de entrar em contato com as amostras (0 min), após 5 e 15 minutos de exposição, na estação seca.

Tabela 11 - Luminescência emitida pela bactéria marinha *Vibrio fischeri*, antes de entrar em contato com as amostras (0 min), após 5 e 15 minutos de exposição, na estação seca.

Tempo (min)	C	1	2	3	4	5	6
0	94	100	90	101	98	94	96
5	100	112	112	120	115	124	121
15	96	124	128	133	130	139	132

Na Tabela 12 e Figura 15, estão apresentados os resultados obtidos através da correlação de efeito entre a concentração e a redução da luminescência, no teste de toxicidade aguda com a bactéria marinha *Vibrio fischeri*, realizado na estação seca.

Tabela 12 - Correlação de efeito entre a concentração e a redução da luminescência, na estação seca.

Amostras	5 min:			15 min:	
	Concentração	Gama (Γ)	% efeito	Gama (Γ)	% efeito
1	81,90	-0.0501	-5.280 %	-0.1764	-21.42%
2	81,90	-0.1451	-16.98%	-0.2819	-39.26%
3	81,90	-0.1046	-11.68%	-0.2244	-28.94%
4	81,90	-0.0934	-10.31%	-0.2301	-29.89%
5	81,90	-0.1935	-24.00%	-0.3094	-44.79%
6	81,90	-0.1560	-18.48%	-0.2573	-34.64%

Figura 15. Correlação de efeito entre a concentração e a redução da luminescência, na estação seca.

Observa-se, nas Tabelas 11 e 12 e Figura 15, que a luminescência emitida pela bactéria marinha aumentou na estação seca após entrar em contato com as amostras por períodos de 5 e 15 minutos de exposição, ou seja, não foi observada inibição da luminescência e sim promoção desta.

5.3 Parâmetros físico-químicos

A seguir, estão apresentados (Tabela 13) os resultados obtidos para os parâmetros físico-químicos no ensaio realizado com o organismo *Daphnia similis*, nas estações chuvosa e seca.

Tabela 13. Resultados dos parâmetros Oxigênio Dissolvido (OD) e pH, para o ensaio com *Daphnia similis*, nas estações chuvosa e seca.

Amostra	C	<i>Daphnia similis</i>							
		1	2	3	4	5	6		
			Estação chuvosa						
OD (mg O ₂ /L)	6,6	7,7	8,1	7,5	7,7	6,6	7,7	≥ 5 mgO ₂ /L	
pH	7,2	7,2	7,3	7,3	7,3	7,2	7,4	6 a 9	
			Estação seca						
OD (mg O ₂ /L)	7,2	6,0	7,8	7,7	6,4	7,1	7,2	≥ 5 mgO ₂ /L	
pH	7,5	6,9	7,4	7,5	7,2	7,2	7,3	6 a 9	

* Temperatura controlada em estufa à 20±2°C (ABNT NBR 12713/2009).

Abaixo (Tabela 14) estão apresentados os resultados obtidos para os parâmetros físico-químicos no ensaio realizado com o organismo *Ceriodaphnia dubia*, nas estações chuvosa e seca.

Tabela 14 - Resultados dos parâmetros Oxigênio Dissolvido (OD) e pH, para o ensaio com *Ceriodaphnia dubia*, nas estações chuvosa e seca.

<i>Ceriodaphnia dubia</i>								
Nº da amostra	C	1	2	3	4	5	6	
Estação chuvosa								
OD (mg O ₂ /L)	6,6	7,3	7,4	7,3	7,4	7,3	7,1	≥ 5 mgO ₂ /L
pH	7,2	7,1	7,2	7,3	7,4	7,5	7,5	6 a 9
Estação seca								
OD (mg O ₂ /L)	7,2	5,7	5,1	5,0	5,2	5,2	5,2	≥ 5 mgO ₂ /L
pH	7,5	7,5	7,5	7,4	7,5	7,5	7,7	6 a 9

* Temperatura controlada em estufa à 25±2°C (ABNT NBR 13373/2010).

Visando assegurar a confiabilidade nos resultados de toxicidade, foram realizadas análises de Oxigênio Dissolvido (OD) e pH no momento da realização dos ensaios com os organismos *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia dubia*, tanto na estação chuvosa quanto na estação seca.

Os valores de OD variaram de 6,6 mg/L a 8,1 mg/L, na estação chuvosa, e de 5,0 mg/L a 7,8 mg/L, na estação seca. Para o parâmetro pH, as variações estiveram entre 7,1 e 7,5, na estação chuvosa, e 6,9 a 7,7, na estação seca. Cabe destacar que o parâmetro Temperatura foi controlado em estufa, mantendo-se a 20±2°C, para *Daphnia similis*, e a 25±2°C, para *Ceriodaphnia dubia*, em todo o período da realização dos ensaios.

Observa-se, nas Tabelas 13 e 14, que os parâmetros analisados estão de acordo com os limites estabelecidos pela Resolução CONAMA 357/2005.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Os testes ecotoxicológicos são utilizados como uma importante ferramenta para identificação de impactos ambientais e seu uso tem se mostrado como alternativa para a avaliação global da contaminação aquática (MEIRELES, 2013). Dessa forma, há um crescente aumento no interesse de indústrias e dos governos em utilizarem os bioensaios para determinação da toxicidade de substâncias químicas e efluentes industriais. Muitos países têm adotado os ensaios biológicos no monitoramento da qualidade da água, visando o desenvolvimento de ensaios mais rápidos, utilizando organismos sensíveis (ZHANG et al., 2005; MARTINS; TELES; VASCONCELOS, 2007; MENDONÇA et al., 2009).

Vale lembrar que os ensaios ecotoxicológicos podem ser classificados como agudos ou crônicos, diferindo principalmente na duração e respostas mensuradas (ALBINATI et al., 2016). Os ensaios de toxicidade aguda avaliam os efeitos severos, como mortalidade ou imobilidade, sofridos pelos organismos expostos à água por um curto período de tempo. Os efeitos agudos, no ambiente aquático, podem ser representados por acidentes ambientais ou lançamento de efluentes industriais sem tratamento. Em contrapartida, os ensaios crônicos avaliam os efeitos decorrentes de exposições à concentrações subletais do contaminante por todo ou parte do ciclo de vida do organismo. Esses ensaios possibilitam avaliar os efeitos de concentrações que permitem a sobrevivência dos organismos, a reprodução deles e o comprometimento de suas funções biológicas (MEIRELES, 2013).

Na avaliação da toxicidade, diferentes organismos podem ser empregados. No entanto, é importante apresentar seletividade e sensibilidade constante aos contaminantes, elevada disponibilidade e abundância, estabilidade genética, representatividade no seu nível trófico, importância ambiental e comercial, facilidade de cultivo e manutenção em laboratório. Dentre estes organismos, destacam-se a bactéria marinha *Vibrio fischeri* e os microcrustáceos *Daphnia similis* e a *Ceriodaphnia dubia*, que são comumente utilizados como organismos-teste em

bioensaios ecotoxicológicos para o monitoramento ambiental (COSTA et al., 2008; MAGALHÃES; FERRÃO-FILHO, 2008).

Analisando os resultados obtidos nos testes de toxicidade aguda com *Daphnia similis* (Tabela 7) e *Vibrio fischeri* (Tabelas 10 e 12), e toxicidade crônica com *Ceriodaphnia dubia* (Tabela 8), observou-se que o microcrustáceo *Ceriodaphnia dubia* foi mais sensível quando comparado aos demais. A maior sensibilidade de *Ceriodaphnia dubia* às amostras pode estar relacionada com a presença de compostos nitrogenados na água, uma vez que a toxicidade de organismos representativos do ambiente aquático apresentam diferentes graus de sensibilidade a diferentes compostos (JANKE, 2009).

Outra hipótese para a diferença de sensibilidade está relacionada com a ingestão de contaminantes, visto que organismos como microcrustáceos e peixes podem ingerir mais substâncias, comparados às bactérias (BARATA et al., 2008). No entanto, a comparação direta entre a sensibilidade desses organismos deve ser realizada com muita cautela, em razão da diferença na complexidade dos organismos-teste (MEIRELES, 2013).

Podemos observar que houve uma diferença de sensibilidade entre os ensaios de toxicidade aguda com *Daphnia similis* e os testes de toxicidade crônica com *Ceriodaphnia dubia*. Segundo Cowgill (1987), essa diferença pode ser atribuída às características fisiológicas do animal (estado nutricional ou estágio no ciclo de vida), condições da cultura (alimentação, temperatura ou fotoperíodo) e propriedades da substância avaliada (solubilidade, degradação ou pureza).

Os microcrustáceos são fundamentais na cadeia alimentar aquática, servindo como alimento de peixes, devido ao alto valor nutricional, a mobilidade e ao tamanho, além de serem importantes na passagem de energia dos produtores primários para os consumidores. A extinção, ou mesmo a redução na população desses organismos, pode afetar a complexa teia

alimentar do ecossistema aquático (SIPAÚBA-TAVARES; ROCHA, 2001; ABRANTES; GONÇALVES, 2003; LEE et al., 2011).

Os dados de toxicidade crônica empregando microcrustáceos são de grande relevância, pois os organismos no ambiente aquático estão expostos a níveis subletais dos contaminantes, devido principalmente a fatores de diluição dos corpos d'água (ARAGÃO; ARAÚJO, 2006). Os poluentes podem causar mudanças no balanço de espécies coexistentes, e a longo prazo, podem alterar a biodiversidade. Esse processo é resultado do aumento ou redução das populações (GUARATINI et al., 2008). Com os resultados obtidos no presente estudo pode-se observar que as populações de microcrustáceos e bactérias foram afetadas especialmente na estação seca, período em que os poluentes estão mais concentrados devido ao menor volume de água nessa época do ano.

Lopes et al. (2009) compararam os efeitos tóxicos da ivermectina em duas linhagens de *Daphnia magna* (europeia e japonesa) e *Ceriodaphnia dubia*, e observaram que há diferenças entre a mesma espécie de *Daphnia magna*, visto que a linhagem japonesa foi mais resistente à ivermectina, quando comparado com a linhagem europeia. Ressalta-se que *Daphnia similis*, utilizada no presente trabalho, apresenta sensibilidade semelhante à *Daphnia magna* (BURATINI; BERTOLETTI; ZAGATTO, 2004). Adicionalmente, Lopes et al. (2009) identificaram maior sensibilidade de *Daphnia magna* comparado com *Ceriodaphnia dubia*, diferentemente dos resultados obtidos no presente estudo.

Ferrão-Filho et al. (2009) avaliaram a exposição de outras espécies de microcrustáceos (*Daphnia gessneri* e *Moina micrura*) a cianotoxinas presentes na água de um reservatório eutrófico, e observaram efeito crônico e baixa mortalidade nos ensaios de toxicidade aguda. Esses resultados expressam a importância dos ensaios crônicos na avaliação da toxicidade de substâncias, como realizado neste estudo utilizando a espécie *Ceriodaphnia dubia* (Tabela 8).

O ensaio de toxicidade aguda com o microcrustáceo *Daphnia similis* tem como parâmetro de análise a mortalidade ou imobilidade dos organismos-teste, e vem sendo utilizado em ensaios experimentais devido ao fácil cultivo em laboratório, utilização de pequeno espaço físico, curto ciclo de vida e curto período de gestação (CAMARGO, 2012). Os resultados obtidos nos ensaios (Tabela 7) mostraram que, dos 600 organismos testados, em ambas as estações do ano de 2016, apenas 8 organismos se mostraram imóveis, representando uma porcentagem de apenas 1,33% do total, não significando toxicidade às amostras testadas.

O ensaio de toxicidade aguda com a bactéria marinha luminescente *Vibrio fischeri* é utilizado como *screening* para uma grande variedade de amostras aquosas, principalmente pela simplicidade e rapidez de sua execução (BORRELY, 2001; PARVEZ et al., 2006). A produção de luz é diretamente proporcional à atividade metabólica da população bacteriana e qualquer inibição da atividade enzimática provoca redução na bioluminescência (PARVEZ et al., 2006).

Nesse sentido, foi possível observar que as amostras coletadas no Rio Pardo não foram capazes de causar efeito na luminescência da população bacteriana exposta (Tabelas 10 e 12). Portanto, considerando que valores de gama abaixo de 0,2 foram interpretados neste estudo como não tóxicos (WANG et al., 2002), 100% das amostras não foram tóxicas para este organismo-teste, uma vez que não foi possível calcular a CE20. Tal fato pode ter ocorrido em razão das baixas concentrações de poluentes presentes nas amostras de água analisadas.

Assim, os resultados obtidos no presente estudo corroboram com os resultados de Hamers et al. (2001), que utilizaram a bactéria *Vibrio fischeri* para avaliar a toxicidade de amostras de água de chuva coletadas em dois locais (área de cultivo agrícola e área preservada), não observando efeito tóxico para a bactéria exposta às amostras de água de chuva.

O ensaio de toxicidade crônica com o microcrustáceo *Ceriodaphnia dubia* tem como parâmetro de análise a alteração na reprodução dos organismos-teste. No entanto, ao expor neonatos de *Ceriodaphnia dubia*, também é possível avaliar o efeito agudo causado pelas

amostras a serem avaliadas (RAND, 1995). Deste modo, os resultados dos ensaios de toxicidade crônica com *Ceriodaphnia dubia* realizados pela CETESB no período de 2010 a 2015 (Figura 13) indicaram que, dentre as amostras testadas, duas foram capazes de provocar efeito agudo aos organismos expostos (nos pontos 2 e 4, na estação seca do ano de 2012), causando a morte dos organismos-teste antes do encerramento dos ensaios. Este resultado sugere que as amostras do Rio Pardo comprometeram a capacidade de reprodução dos organismos expostos. Como pode ser observado na Tabela 8, para as amostras testadas no presente estudo em ambas as estações do ano de 2016, não foi observado efeito agudo (EA).

Além do efeito agudo, também foi observado efeito crônico para *Ceriodaphnia dubia* expostas às amostras de água superficial, tanto no presente estudo (Tabela 8), quanto nos resultados fornecidos pela CETESB (Figura 13). Esse efeito foi verificado ao se comparar o número de organismos nascidos de *Ceriodaphnia dubia* expostas às amostras do Rio Pardo com o número de neonatos pertencentes ao grupo controle. Por meio dos resultados obtidos neste estudo, foi possível verificar que as amostras coletadas nos pontos 2, 3 e 5, na estação seca, provocaram efeito crônico aos organismos (Tabela 8).

A comparação entre os resultados do presente estudo com os dados fornecidos pela CETESB mostrou que, em ambas as estações do ano, a maioria das amostras não apresentou toxicidade, sendo classificadas como Não Tóxicas (NT). No ensaio com *Ceriodaphnia dubia*, os parâmetros físico-químicos analisados (Tabela 14) estão de acordo com os limites estabelecidos pela Resolução CONAMA 357/2005. As amostras apresentaram moderadas variações de Oxigênio Dissolvido (OD), que estiveram entre 5,0 mg/L e 7,4 mg/L, baixa variação de pH, entre 7,1 e 7,7, e a Temperatura manteve-se a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, em todo o período de realização dos ensaios, o que não justifica-se relacionar os parâmetros OD, pH e Temperatura com os níveis de toxicidade detectados em 25% das amostras. Cabe destacar que os reflexos sobre a toxicidade não são oriundos unicamente ao parâmetro em si, mas ao conjunto de

interações que interferem na biodisponibilidade dos contaminantes (RODRIGUES; SILVA; SILVA, 2009).

Ao observar os resultados obtidos nos ensaios ecotoxicológicos empregados para *Ceriodaphnia dubia*, é possível afirmar que houve similaridade entre os resultados obtidos neste estudo com os dados fornecidos pela CETESB, indicando que a causa do efeito observado nos ensaios possivelmente seja a mesma.

No presente estudo optou-se pela amostragem em dois períodos do ano devido ao regime de chuvas presente no Brasil, que apresenta sazonalidade, com estações secas e chuvosas em diferentes épocas do ano, de acordo com a localização geográfica (FIGUEROA; NOBRE, 1989). A sazonalidade pode comprometer os parâmetros físico-químicos e biológicos nos rios, seja pela alteração da diluição e assimilação pelo aumento ou redução da vazão, ou pela entrada de sedimentos com contaminantes ao sistema fluvial (PINTO et al., 2015).

A concentração de poluentes encontrada nas águas superficiais difere em função da sazonalidade. Alguns poluentes apresentam valores mais elevados nas estações chuvosas, devido, principalmente, à ação do escoamento superficial (lixiviação) das áreas agrícolas e de pastagens pela ocorrência de eventos de precipitação em contraste com a estação seca. Durante a estação seca, os rios são abastecidos preponderantemente pelo escoamento subsuperficial, reduzindo a quantidade de sólidos e, conseqüentemente, os poluentes que adentram os recursos hídricos (ANDRIETTI et al., 2016). Em contrapartida, na estação seca, os poluentes se concentram mais e podem ser facilmente detectados.

Embora tenham sido observados resultados positivos no presente estudo, outros autores destacam alguns fatores que ainda devem ser investigados de maneira mais minuciosa, como é o caso do estudo realizado por Machado et al. (2016), que verificaram a contaminação química da água e do sedimento nos mesmos pontos de amostragem (Rio Pardo) analisados no presente estudo. Foram detectados cinco metais (Al, Cu, Mn, Zn, Cd) na água do rio que apresentaram

valores acima dos limites estabelecidos pela legislação brasileira. Observaram que o Cu, o Mn, o Zn e o Cd apresentaram maiores concentrações na água durante a estação chuvosa e relacionaram esses resultados ao maior volume de água no rio nessa época do ano, que podem ter origens em várias fontes, tais como a contaminação do solo, atividades de mineração, transporte de poluentes atmosféricos pela chuva e escoamento superficial da cidade.

Ainda no estudo realizado por Machado et al. (2016) foram detectados herbicidas na água do rio em cinco dos seis pontos de amostragem, indicando a ampla faixa de aplicação destes na Bacia Hidrográfica do Rio Pardo. Nos pontos 2, 3 e 5 do presente estudo, verificou-se efeito crônico para os organismos de *Ceriodaphnia dubia* na estação seca, evidenciando que esses herbicidas no ambiente aquático podem afetar os animais devido a efeitos tóxicos no sistema endócrino e ao potencial carcinogênico (MACHADO et al., 2016).

O controle da toxicidade no ambiente aquático é de extrema importância para a saúde do ecossistema e do homem. Os testes de ecotoxicidade podem ser utilizados para demonstrar a probabilidade de toxicidade de uma fonte de poluição para a biota aquática. Partindo-se do pressuposto de que um agente é tóxico para uma ou mais espécies em um sistema de teste, é provável que também seja tóxico para importantes componentes do ecossistema e, portanto, capaz de causar impacto ambiental negativo (MAGALHÃES; FERRÃO-FILHO, 2008).

Através de sistemas de biomonitoramento com análises de indicadores comportamentais sensíveis e apropriados, é possível avaliar o impacto ambiental como uma alternativa ao uso de testes de toxicidade com respostas como mortalidade, crescimento e reprodução. No futuro, as substâncias lançadas no ambiente poderão ser reduzidas a níveis que protejam a viabilidade dos seres vivos, não apenas seu envolvimento com a mortalidade, mas também prevenindo alterações no comportamento e garantindo a estrutura das comunidades aquáticas. (MAGALHÃES; FERRÃO-FILHO, 2008).

A Ecotoxicologia é, portanto, uma área de conhecimento que pode ser utilizada para auxiliar no entendimento da qualidade de recursos hídricos devido a sua ampla faixa de atuação. A Ecotoxicologia pode ser utilizada antes ou após a ocorrência de um evento de poluição. Em estudos preliminares, para investigar os efeitos relativos à introdução de uma substância, diferentes tipos de testes devem ser realizados para avaliar a toxicidade do agente tóxico e garantir que este não causará danos à biota. Posteriormente, para avaliar o efeito adverso produzido no ambiente pela introdução de uma substância, considerando as interações químicas, físicas e biológicas com os fatores abióticos do ambiente. Os resultados provenientes dos estudos ecotoxicológicos podem ser empregados no monitoramento de ecossistemas, de maneira a detectar impactos acidentais ou decorrentes de atividades antrópicas (MAGALHÃES; FERRÃO-FILHO, 2008).

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

Levando-se em consideração o objetivo geral deste estudo em avaliar a toxicidade de amostras de água superficial provenientes do Rio Pardo, em ambas as estações do ano de 2016, para os organismos bioindicadores *Daphnia similis*, *Ceriodaphnia dubia* e *Vibrio fischeri*, observou-se que a maior parcela das amostras coletadas apresentaram-se não tóxicas (NT) aos organismos testados. Apesar do Rio Pardo estar inserido em área com reconhecido uso de produtos agrícolas e pouca proteção de Áreas de Preservação Permanente (APP), os resultados mostraram toxicidade apenas para o organismo *Ceriodaphnia dubia*, na estação seca do ano de 2016. Cabe destacar a importância da manutenção do monitoramento periódico pela Agência Ambiental do Governo do Estado de São Paulo (CETESB), considerando o Art. 14 da Resolução CONAMA 357/2005, que prevê a “não verificação de efeito tóxico crônico a organismos” para águas doces de Classe 1 e 2. As conclusões alcançadas a partir da análise dos resultados obtidos quanto aos objetivos específicos estão listadas a seguir:

- **Ensaio de toxicidade aguda com *Daphnia similis***

Nos ensaios de toxicidade aguda realizados com *Daphnia similis*, tanto no mês de fevereiro (estação chuvosa), quanto no mês de agosto (estação seca), não observou-se toxicidade sobre os organismos testados. Todas as amostras foram classificadas como Não Tóxicas (NT).

- **Ensaio de toxicidade crônica com *Ceriodaphnia dubia***

Na estação chuvosa, nenhuma das amostras analisadas apresentou toxicidade crônica para *Ceriodaphnia dubia*. As amostras analisadas na estação seca apresentaram diferença estatisticamente significativa entre o número médio de neonatos produzidos por adulta no controle (19,2), e, nas amostras 2 (10,7), 3 (10,5) e 5 (8,1), e, o efeito observado foi crônico

(EC). No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa nas amostras 1 (13,7), 4 (12,3) e 6 (14,3) - Não Tóxicas (NT).

- **Ensaio de toxicidade aguda com *Vibrio fischeri***

Nos ensaios de toxicidade aguda realizados com *Vibrio fischeri*, nos dias 25 de fevereiro (estação chuvosa) e 25 de outubro (estação seca) de 2016, não observou-se toxicidade sobre a bactéria após os períodos de 5 e 15 minutos de exposição. Todas as amostras foram classificadas como Não Tóxicas (NT).

- **Parâmetros físico-químicos**

Os parâmetros físico-químicos analisados estão de acordo com os limites estabelecidos pela Resolução CONAMA 357/2005. Portanto, os valores de OD, pH e Temperatura não interferiram na toxicidade das amostras.

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

- ABNT (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS) NBR 15469. **Ecotoxicologia aquática - Preservação e preparo de amostras**. Norma ABNT - NBR 15469. 7 p, 2007.
- _____. NBR 12713. **Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia* spp. (Crustacea, Cladocera)**. Norma ABNT - NBR 12713. 23p, 2009.
- _____. NBR 13373. **Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com *Ceriodaphnia* spp. (Crustacea, Cladocera)**. Norma ABNT - NBR 13373. 18 p, 2010.
- _____. NBR 15411-3. **Ecotoxicologia aquática - Determinação do efeito inibitório de amostras aquosas sobre a emissão da bioluminescência de *Vibrio Fischeri* (ensaio de bactéria luminescente) - Parte 3: Método utilizando bactérias liofilizadas**. Norma ABNT - NBR 15411-3. 23 p, 2012.
- ABRANTES, N.; GONÇALVES, F. The dynamics of *Ceriodaphnia pulchella* (Cladocera) in laboratory. **Acta Oecologica**, v. 24, p. 245-249, 2003.
- ADAMS, W. J.; ROWLAND, C. D. **Em Handbook of Ecotoxicology**; Hoffman, D. J.; Rattner B. A.; Burton Jr., G. A.; Cairns Jr., J., eds.; 2nd ed., cap. 2. Lewis Publishers: Boca Raton, 2003.
- AJIMA, M. N. O.; NNODI, P. C.; OGO, O. A.; ADAKA, G. S.; OSUIGWE, D. I.; NJOKU, D. C. Bioaccumulation of heavy metals in Mbaa River and the impact on aquatic ecosystem. **Environmental Monitoring and Assessment**, p. 187: 768, 2015.
- ALBINATI, A. C. L.; ALBINATI, R. C. B., LIRA, A. D., SOARES, P. C. Toxicidade aguda e risco ecotoxicológico do inseticida tiametoxam para alevinos de tilápia-do-nilo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.68, n.5, p.1343-1350, 2016.
- ALHASHEMI A. H.; SEKHAVATJOU M. S.; KIABI B. H.; KARBASSI A. R. Bioaccumulation of trace elements in water, sediment, and six fish species from a freshwater wetland, Iran. **Microchemical Journal**, v. 104, p. 1-6, 2012.
- ALVES, A. C. B.; SILVANO, J. Avaliação da sensibilidade de *Daphnia magna* Straus, 1820 (Cladóceras, Crustácea) ao dicromato de potássio. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 65(1), p. 59-61, 2006.
- ALVES, R. I. S. **Avaliação de parâmetros limnológicos, parasitas, bactérias e metais pesados em água superficial no córrego Ribeirão Preto, Ribeirão Preto - SP**. 2009. 112f. Dissertação (Mestrado em Enfermagem em Saúde Pública) - Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.
- ANA (AGÊNCIA NACIONAL DAS ÁGUAS). **Geo Brasil: recursos hídricos: componente da série de relatórios sobre o estado e perspectivas do meio ambiente no Brasil**, 2007. Disponível em: <<http://www.ana.gov.br/bibliotecavirtual/>> Acesso em: 04 nov. 2015.

_____. **Cadernos de Capacitação em Recursos Hídricos**, 2011. Disponível em: <<http://arquivos.ana.gov.br/institucional/sge/CEDOC/Catalogo/2012/OutorgaDeDireitoDeUs oDeRecursosHidricos.pdf>> Acesso em: 04 nov. 2015.

_____. **Resolução nº 1021/2013 Outorga Preventiva**, CNARH 35.0.0075160/24. Disponível em: [http://outorga-ana.snirh.gov.br/QvAJAXZfc/opendoc.htm?document=CNARH10_publica.qvw&host=QVS %40tejo&anonymous=true](http://outorga-ana.snirh.gov.br/QvAJAXZfc/opendoc.htm?document=CNARH10_publica.qvw&host=QVS%40tejo&anonymous=true). Acesso em 07 fev. 2016.

_____. **Conjuntura dos recursos hídricos no Brasil: Informe 2014** - Brasília: ANA, 2014.

_____. **Regiões hidrográficas**. 2017. Disponível em: <http://www2.ana.gov.br/Paginas/portais/bacias/default.aspx>. Acesso em: 09 fev. 2017.

ANDRIETTI, G.; FREIRE, R.; AMARAL, A. G.; ALMEIDA, F. T.; BONGIOVANI, M. C.; SCHNEIDER, R. M. Índices de qualidade da água e de estado trófico do rio Caiabi, MT. **Ambiente & Água**, Taubaté, vol. 11, n. 1, 2016.

ARAGÃO, M. A.; ARAÚJO, R. P. A. **Métodos de Ensaio de Toxicidade com Organismos Aquáticos**. In: Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações. ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. São Carlos: RiMa. p. 117-147, 2006.

ARAÚJO, G. F. R.; TONANI, K. A. A.; JULIÃO, F. C.; CARDOSO, O. O.; ALVES, R. I. S.; RAGAZZI M. F.; SAMPAIO, C. F.; SEGURA-MUÑOZ, S. I. Qualidade físico-química e microbiológica da água para o consumo humano e a relação com a saúde: estudo em uma comunidade rural no estado de São Paulo. **O Mundo da Saúde**, São Paulo, v. 35, p. 98-104, 2011.

ARAÚJO, R. P. A.; SHIMIZU, G. Y.; BOHRER-MOREL, M. B. C.; JARDIM, W. F. **Avaliação da Qualidade de Sedimentos**. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações. São Carlos: RiMa, p. 269-286, 2006.

AZANIA, A. A. P. M.; AZANIA, C. A. M.; GRAVENA, R.; PAVANI, M. C. M. D.; PITELLI, R. A. Sugar cane (*Saccharum* spp.) straw interference in emergence of weed species of the convolvulaceae Family. **Planta daninha**, v. 20, n. 2, 2002.

AZEVEDO, F. A., CHASIN, A. A. M. **Metais: gerenciamento da toxicidade**. São Paulo: Atheneu, 2003.

AZUR ENVIRONMENTAL, 1998. Microtox Acute Toxicity Test. Disponível em: <http://www.coastalbio.com/images/Acute_Overview.pdf>. Acesso em 02 mar 2017.

BAIRD, C. **Química Ambiental**, Bookman, 4 ed., p. 844, 2011.

BANERJEE, U. S.; GUPTA, S. Impact of industrial waste effluents on river Damodar djacente to Durgapur industrial complex, West Bengal, India. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 185; p. 2083-2094, 2013.

BAO, L. J.; MARUYA, K. A.; SNYDER, S. A.; ZENG, E. Y. China's water pollution by persistent organic pollutants. **Environmental Pollution**, v. 163, p. 100-108, 2012.

BARATA, C.; ALAÑON, P.; GUTIERREZ-ALONSO, S.; RIVA, M.C.; FERNÁNDEZ, C.; TARAZONA, J. V. A *Daphnia magna* feeding bioassay as a cost effective and ecological relevant sublethal toxicity test for environmental risk assessment of toxic effluents. **Science of the Total Environment**, v. 405, p. 78-86, 2008.

BASTOS, W. R.; LACERDA, L. D. A contaminação por mercúrio na Bacia do Rio Madeira: uma breve revisão. **Geochimica Brasiliensis**, v. 18, p. 99-114, 2004.

BOLUDA, R.; QUINTANILHA, J. F.; BONILLA, J. A.; SÁEZ, E.; GAMÓN, M.; **Chemosphere**, v. 46, p. 355, 2002.

BORRELY, S. I. **Redução da toxicidade aguda de efluentes industriais e domésticos tratados por irradiação com feixes de elétrons, avaliada com as espécies *Vibrio fischeri*, *Daphnia similis* e *Poecilia reticulata***. 2001. 113f. Tese (Doutorado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Aplicações) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Autarquia Associada à Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

BORRELY, S. I.; TORNIERI, P. H.; SAMPA, M. H. O. **Avaliação da toxicidade aguda em efluentes industriais, afluentes e efluentes de estação de tratamento de esgotos**. 395-406 p. In: E. L. G. Espíndola, C. M. R. Botta-Paschoal, O. Rocha, M. B. C. Bohrer & A. L. Oliveira-Neto (eds.) *Ecotoxicologia: perspectivas para o século XXI*. RiMa, São Carlos, São Paulo, 2002.

BRASIL. LEI nº 7.663, de 30 de dezembro de 1991. Estabelece normas de orientação à Política Estadual de Recursos Hídricos bem como ao Sistema Integrado de Gerenciamento de Recursos Hídricos, 1991.

BURATINI, S. V.; BERTOLETTI, E.; ZAGATTO, P. A. Evaluation of *Daphnia similis* as a test species in ecotoxicological assays. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 73, p. 878-882, 2004.

CAETANO, I.; ANTUNES, M. A linguagem das bactérias. **Revista Ciência Hoje**, São Paulo, Maio, p. 16, 2003.

CAMARGO, R. C. **Avaliação do potencial poluidor dos efluentes gerados em processo de fabricação de cervejas**. 2012. 98f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Ambiental) - Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP, Ribeirão Preto, 2012.

CARDONA, S.; SUAREZ, E. Biodegradation pathway prediction of POPs (Persistent Organic Pollutants) and biobarrier treatment. **Dyna Rev. Fac. Nac. Minas**, Colombia, v. 77, n. 163. 2010.

CBH. Comitê de Bacias Hidrográficas. 2015. Disponível em: <http://www.cbh.gov.br/>. Acesso em: 10 set. 2015.

CBH-PARDO. **Relatório de situação dos recursos hídricos da bacia hidrográfica 2014 (ano base 2013)**. Comitê da Bacia Hidrográfica do Pardo, Ribeirão Preto, 2014.

CETESB (COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO). **Influência de agentes tóxicos no tratamento de esgotos por via biológica - Processo de lodo ativado**. São Paulo, p. 31, 1986.

_____. **Métodos de Avaliação da Toxicidade de Poluentes a Organismos Aquáticos**. Vol 1. (Apostila de Curso Treinamento Prático Especializado), 1997.

_____. **Água. Relatório de Qualidade das Águas Superficiais do Estado de São Paulo**, 2007. Disponível em: < <http://aguasinteriores.cetesb.sp.gov.br/publicacoes-e-relatorios/>> Acesso em: 05 nov. 2015.

_____. **Água. Relatório de Qualidade das Águas Superficiais do Estado de São Paulo**, 2010. Disponível em: < <http://aguasinteriores.cetesb.sp.gov.br/publicacoes-e-relatorios/>> Acesso em: 05 nov. 2015.

_____. **Métodos de Avaliação da Toxicidade e Poluentes a Organismos Aquáticos**. São Paulo. v. 1, 2011.

_____. **Água. Relatório de Qualidade das Águas Superficiais do Estado de São Paulo**, 2012. Disponível em: <<http://aguasinteriores.cetesb.sp.gov.br/publicacoes-e-relatorios/>>. Acesso em : 05 nov. 2015.

_____. **Ficha de Informação Toxicológica. Manganês. Divisão de Toxicologia, Genotoxicidade e Microbiologia Ambiental**, 2012.

_____. **Água. Relatório de Qualidade das Águas Superficiais do Estado de São Paulo**, 2014. Disponível em: <<http://aguasinteriores.cetesb.sp.gov.br/wp-content/uploads/sites/32/2013/11/agua-doce-parte1-corrigido.pdf>> Acesso em: 14 jan. 2016.

_____. **Relatório de qualidade das águas superficiais no estado de São Paulo: relatório técnico**. São Paulo: CETESB, 2015. 310p.

CHAPMAN, P. M. Determining when contamination is pollution – Weight of evidence determinations for sediments and effluents. **Environment International**, v. 33, p. 492–501, 2007.

CHASIN, A. A. M., PEDROZO, M. F. M. O estudo da Toxicologia. In: Azevedo, F. A. Chasin, A. A. M. (eds.). **As Bases Toxicológicas da Ecotoxicologia**, São Carlos: RiMa, p. 330, 2003.

CIIAGRO (CENTRO INTEGRADO DE INFORMAÇÕES AGROMETEOROLÓGICAS), 2017. Disponível em: < <http://www.ciiagro.sp.gov.br/ciiagroonline/Quadros/QChuvaPeriodo.asp>> Acesso em: 05 mar. 2017.

CLAVIJO, A.; KRONBERG, M. F.; ROSSEN, A.; MOYA, A.; CALVO, D.; SALATINO, S. E.; PAGANO, E. A.; MORÁBITO, J. A.; MUNARRIZ, E. R. The nematode *Caenorhabditis elegans* as an integrated toxicological tool to assess water quality and pollution. **Science of the Total Environment**. v. 569-570, p. 252-261, 2016.

COELHO, K. S.; ROCHA, O. Assessment of the potential toxicity of a linear alkylbenzene sulfonate (LAS) to freshwater animal life by means of cladoceran bioassays. **Ecotoxicology**, v. 19, p. 812-818, 2010.

COLEMAN, R. N.; QURESHI, A. A.; **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 35, p. 443, 1985.

CONAMA (CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE). Resolução nº 01, de 23 de janeiro de 1986. **Dispõe sobre critérios básicos e diretrizes gerais para a avaliação de impacto ambiental**. Disponível em:

<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=23>. Acesso em: 04 nov. 2015.

_____. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. **Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências**. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459>. Acesso em: 15 fev. 2017.

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

COSTA, S. P. F.; PINTO, P. C. A. G.; LAPA, R. A. S.; SARAIVA, M. L. M. F. S. Toxicity assessment of ionic liquids with *Vibrio fischeri*: An alternative fully automated methodology. **Journal of Hazardous Materials**, v. 284, p. 136-142, 2015.

COWGILL, U. M. Critical analysis of factors affecting the sensitivity of zooplankton and the reproducibility of toxicity test results. **Water Research**, v. 21, p. 1453-1462, 1987.

DANTAS, A. D. B.; PASCHOALATO, C. F. P. R.; BALLEJO, R. R.; BERNARDO, L. D. Pré-oxidação e adsorção em carvão ativado granular para remoção dos herbicidas Diuron e Hexazinona de água subterrânea. **Engenharia Sanitária Ambiental**, v. 14, n. 3, p. 373-380, 2009.

DORNFELD, C. B.; Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, Brasil, 2002.

DOSP. Diário Oficial do Estado de São Paulo. 1969. Disponível em <http://www.jusbrasil.com.br/diarios/5039538/pg-22-ineditoriais-diario-oficial-do-estado-de-sao-paulo-dosp-de-23-10-1969>. Acessado em 07 fev. de 2017.

_____. Diário Oficial do Estado de São Paulo. 1978. Disponível em <http://www.jusbrasil.com.br/diarios/6209310/pg-88-poder-executivo-diario-oficial-do-estado-de-sao-paulo-dosp-de-06-06-1978>. Acessado em 07 fev. de 2017.

_____. Diário Oficial do Estado de São Paulo. 2011. Disponível em <http://www.jusbrasil.com.br/diarios/29430037/pg-78-executivo-caderno-1-diario-oficial-do-estado-de-sao-paulo-dosp-de-09-08-2011>. Acessado em 07 fev. de 2017.

_____. Diário Oficial do Estado de São Paulo. 2012. Disponível em <http://www.jusbrasil.com.br/diarios/41750097/dosp-empresarial-25-10-2012-pg-22>. Acessado em 07 fev. de 2017.

_____. Diário Oficial do Estado de São Paulo. 2015. Disponível em <http://www.jusbrasil.com.br/diarios/88618279/dosp-empresarial-25-03-2015-pg-116>. Acessado em 07 fev. de 2017.

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

FIGUEIREDO, F. G.; LIMA, L. F.; MORAIS-BRAGA, M. F. B.; FIGUEIREDO, J. G.; PINTO, N. B.; MATIAS, E. F. F.; MENEZES, I. R. A.; ALMEIDA, R. S.; CUNHA, F. A. B.; COUTINHO, H. D. M. Avaliação do potencial citoprotetor contra efeito tóxico do cloreto de mercúrio e antioxidante de *Lygodium venustum* SW (lygodiaceae). **Revista Interfaces**, v. 3, n. 9, p. 44-49, 2016.

FIGUEROA, S. N.; NOBRE, C. A. Precipitation distribution over Central and Western tropical South America. **Climanálise**, 5: 36-45, 1989.

FURTULA, V.; OSACHOFF, H.; DERKSEN, G.; JUAHIR, H.; COLODEY, A.; CHAMBERS, P. Inorganic nitrogen, sterols and bacterial source tracking as tools to characterize water quality and possible contamination sources in surface water. **Water Research**, v. 46, n. 4, p. 1079-1092, 2012.

GARBELLINI, G.; ULIANA, C. Toxidez, degradação no meio ambiente e métodos eletroanalíticos de detecção do pesticida carbaril. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 17, p. 29-36, 2007.

GASPARIK, J.; VLADAROVA, D.; CAPCAROVA, M.; SMEHYL, P.; SLAMECKA, J.; GARAJ, P.; STAWARZ, R.; MASSANYI, P. Concentration of lead, cadmium, mercury and arsenic in leg skeletal muscles of three species of wild birds. **Journal of Environmental Science and Health - Part A, Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering**, v. 45, p. 818-823, 2010.

GEMMELL, M. E.; SCHMIDT, S. Is the microbiological quality of the Msunduzi River (KwaZulu-Natal, South Africa) suitable for domestic, recreational, and agricultural purposes? **Environmental Science and Pollution Research**, v. 20(9), p. 6551-6562, 2013.

GEMG. Governo do Estado de Minas Gerais. Secretaria de Estado de Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável. Superintendência Regional de Regularização Ambiental Sul de Minas. Protocolo nº 0931728/2012. Licenciamento Ambiental nº 12756/2011/001/2011.

_____. Governo do Estado de Minas Gerais. Secretaria de Estado de Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável. Superintendência Regional de Regularização Ambiental Sul de Minas. PARECER ÚNICO nº 2035495/2013. 22/03/2013. Licença de Operação - Ampliação.

_____. Governo do Estado de Minas Gerais. Secretaria de Estado de Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável. Superintendência Regional de Regularização Ambiental Sul de Minas. PARECER ÚNICO Nº 787671/2014 (SIAM)

GERARDI-GOLDSTEIN, E.; ZAGATTO, P.A.; ARAÚJO, R.P.A.; BETOLETTI, E. **Avaliação da toxicidade dos principais despejos industriais da região da ERQ- Suzano, através de ensaios biológicos**. Revista DAE (132), São Paulo, p.42-48, 1983.

GERARDI-GOLDSTEIN, E.; BERTOLETTI, E., ZAGATTO, P. A., ARAUJO, R. P. A.; RAMOS, M. L. L. C. **Procedimentos para Utilização de Testes de Toxicidade no Controle de Efluentes Líquidos**, Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB): São Paulo, 1990.

GERBASE, A. E.; OLIVEIRA, C. R. Reciclagem do lixo de informática: uma oportunidade para a química. **Química Nova**, São Paulo, v. 35, n.7, p. 1486-1492. 2012.

GLEICK, P. H. Making every drop count. **Scientific American**, v. 284, n. 2, p. 28-33, 2001.

GRAZIANO, J. H.; BLUM, C. B.; LOLACONO, N. J.; SLAVKOVICH, V.; MANTON, W. I.; POND, S.; MOORE, M. R. A human in vivo model for the determination of lead bioavailability using stable isotope dilution. **Environmental Health Perspectives** v. 104, p. 176-179, 1996.

GUARATINI, T.; CARDOZO, K. H. M.; PAVANELLI, D. D.; COLEPICOLO, P.; PINTO, E. 2008. In: Oga, S.; Camargo, M. M. A.; Batistuzzo, J. A. O. **Fundamentos de Toxicologia**, 3ª ed. São Paulo: Atheneu. p.127-141.

HAMERS T., SMIT M. G. D., MURK, A. J., KOEMAN, J. H. Biological and chemical analysis of the toxic potency of pesticides in rainwater. **Chemosphere**, n.45, p.609-624, 2001.

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

HARMEL, V. C. **Padronização de um teste de Biotoxicidade Crônica com a Bactéria Luminescente *Vibrio fischeri* para Análise de Qualidade de Águas Superficiais**. Dissertação de Mestrado, Universidade Regional de Blumenau, Brasil, 2004.

HOUAISS. **Dicionário da Língua Portuguesa**. Editora Objetiva, 2001.

IBGE (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA). **Área Territorial Brasileira**, 2013. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/geociencias/cartografia/default_territ_area.shtm> Acesso em: 05 nov. 2015.

_____. **Produção das safras de 2013 e 2014 – Brasil**, 2014. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201404_5.shtm> Acesso em: 05 jan. 2016.

_____. **Projeção da População Brasileira**, 2015. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/apps/populacao/projecao/index.html>> Acesso em: 05 nov. 2015.

JANKE, H. **Avaliação ecotoxicológica da adição de nitrato em sedimentos eutrofizados da represa Ibirité (Betim/MG): experimentos em microcosmos**. 2009. 103 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais do Centro das Ciências Biológicas e da Saúde). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.

KEATING, K. I. A system of defined (*Sensu stricto*) media for daphnid (Cladocera) culture. **Water Research**, v. 19, p. 73-78, 1985.

KENDALL, R. J. et al.; **Em Casarett and Doull's Toxicology – The Basic Science of Poisons**; Klaassen, C. D., ed.; 6th ed., MacGraw-Hill: New York, cap. 29, 2001.

LAVORGNA, M.; RUSSO, C.; D'ABROSCA, B.; PARRELLA, A.; ISIDORI, M. Toxicity and genotoxicity of the quaternary ammonium compound benzalkonium chloride (BAC) using *Daphnia magna* and *Ceriodaphnia dubia* as model systems. **Environmental Pollution**. v. 210, p. 34-39, 2016.

LE, Q. A. V.; SEKHON, S. S.; LEE, L. KO, J. H.; MIN, J. *Daphnia* in Water Quality Biomonitoring - “Omic” Approaches. **Toxicology Environmental Health**. v. 8, p. 1-6, 2016.

LEE, J.; JI, K.; KHO, Y. L.; KIM, P.; CHOI, K. Chronic exposure to diclofenac on two freshwater cladocerans and Japanese medaka. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, p. 1216-1225, 2011.

LIMA, J. E. F. W. **Determinação e simulação da evapotranspiração de uma bacia hidrográfica do Cerrado**. 75f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Brasília, Brasília, 2000.

LIU, H.; RU, J.; QU, J.; DAI, R.; WANG, Z.; HU, C. Removal of persistent organic pollutants from micro-polluted drinking water by triolein embedded absorbent. **Bioresource Technology**, Mohali, v. 100, n. 12, p. 2995–3002, 2009.

LOPES, C.; CHARLES, S.; VOLLAT, B.; GARRIC, J. Toxicity of ivermectin on cladocerans: comparison of toxic effects on *Daphnia* and *Ceriodaphnia* species. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 28, p. 2160-2166, 2009.

LÓPEZ-DOVAL, J. C.; MEIRELLES, S. T.; CARDOSO-SILVA, S.; MOSCHINI-CARLOS, V.; POMPÊO, M. Ecological and toxicological responses in a multistressor scenario: Are monitoring programs showing the stressors or just showing stress? A case study in Brazil. **Science of the Total Environment**, v. 540, p. 466-476, 2016.

MA, X. Y.; WANG, X. C.; NGO, H. H.; GUO, W.; WU, M. N.; WANG, N. Bioassay based luminescent bacteria: Interferences, improvements, and applications. **Science of Total Environment**, v. 469, p. 1-11, 2014.

MACHADO, C. S.; ALVES R. I. S.; FREGONESI B. M.; TONANI K. A. A.; MARTINIS B. S.; SIERRA, J.; NADAL, M.; DOMINGO, J. L.; SEGURA-MUÑOZ, S. Chemical

contamination of water and sediments in the Pardo River, São Paulo, Brazil. **Procedia Engineering**, v. 162, p. 230-237, 2016.

MACHADO, C. S. **Quantificação do risco à saúde humana pela exposição a poluentes químicos e potencial carcinogênico às comunidades adjacentes ao Rio Pardo, Brasil**. 2016. 175f. Tese (Doutorado em Ciências na área de Enfermagem Saúde Pública). Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto/USP.

MAGALHÃES, D. P.; FERRÃO-FILHO, A. S. A ecotoxicologia como ferramenta de biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Australis**, v. 12, n. 3, p. 355-381, 2008.

MANZI, M. Água: como enxergamos este tema na Rio+20?, por Marcelo Manzi. **Revista Eletrônica do Vestibular UERJ**, v. 4, n. 12, 2011.

MARTINS, J.; TELES, L. O.; VASCONCELOS, V. Assays with *Daphnia magna* and *Danio rerio* as alert systems in aquatic toxicology. **Environment International**, v. 33, p. 414-425, 2007.

MEDEIROS, R. J.; SANTOS, L. M. G.; FREIRE, A. S.; SANTELLI, R. E.; BRAGA, A. M. C. B.; KRAUSS, T. M.; JACOB, S. C. Determination of inorganic trace elements in edible marine fish from Rio de Janeiro State, Brazil. **Food Control**, Reading, v. 23, p. 535-541. 2012.

MEIRELES, G. **Avaliação eco/genotoxicológica dos corantes têxteis Reactive Blue 4 e Reactive Blue 15, Ribeirão Preto**. 2013. 90 f. Dissertação (Mestrado e Toxicologia) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

MENDONÇA, E.; PICADO, A.; PAIXÃO, S. M.; SILVA L.; CUNHA, M. A.; LEITÃO, S.; MOURA, I.; CORTEZ, C.; BRITO, F. Ecotoxicity tests in the environmental analysis of wastewater treatment plants: Case study in Portugal. **Journal of Hazardous Materials**, v. 163, p. 665-670, 2009.

MILANEZ, B.; FERNANDES, L. O.; PORTO, M. F. S. A co-incineração de resíduos de fornos de cimento: riscos para a saúde e o meio ambiente. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 14, n. 6, 2009.

MONTES, C. S., FERREIRA M. A. P., SANTOS, S. S. D.; ESTHER IRIS CHRISTINA FREIFRAU VON LEDEBUR, E. I. C. F. V.; ROCHA, R. M. Branchial histopathological study of *Brachyplatystoma rousseauxii* (Castelnau, 1855) in the Guajará bay, Belém, Pará State, Brazil. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 32, n. 1, p. 93-99, 2010.

NADAL, M.; SCHUHMACHER, M.; DOMINGO, J. L. Long-term environmental monitoring of persistent organic pollutants and metals in a chemical/petrochemical area: Human health risks. **Environmental Pollution**, Rensselaer, v. 159, n. 7, p. 1769–1777, 2011.

NOBRE, C. A.; MARENGO, J. A.; SELUCHI, M. E.; CUARTAS, L. A.; ALVES, L. M. Some characteristics and impacts of the drought and water crisis in Southeastern Brazil during 2014 and 2015. **Journal of Water Resource and Protection**, Williamsburg, v. 8, p. 252-262, 2016.

NORBERG-KING, T. J. **A linear interpolation method for sublethal toxicity: the inhibition concentration (ICp) approach**. Version 2.0 (software). US.EPA-Duluth, Minnesota, 1993.

OMM (ORGANIZAÇÃO METEOROLÓGICA MUNDIAL). **Há água suficiente no mundo?** Genève: OMM; UNESCO, Paris, 22 p, 1997.

PAPENFORT, K.; BASSLER, B. L. Quorum sensing signal–response systems in Gram-negative bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 9, p. 576-588, 2016.

PARVEZ, S., VENKATARAMAN, C., MUKHERJI, S. A review on advantages of implementing luminescence inhibition test (*Vibrio fischeri*) for acute toxicity prediction of chemicals. **Environment International**, n.32, p. 265-268, 2006.

PEIRANO, M. M. F. Remoção de Metais Pesados no Tratamento Biológico - Sistema Biológico Tipo Lodos Ativados. **Revista Gerenciamento Ambiental**, v. 24, p. 51-53, 2003.

PELAEZ-RODRIGUEZ, M.; PERET, A.M.; MATSUMURA -TUNDISI, T.; ROCHA, O. Análise da qualidade da água e aplicação do índice de proteção da vida aquática (IVA) em duas sub-bacias da Bacia Hidrográfica do Rio Jacaré-Guaçu. In: **Ecotoxicologia: Perspectivas para o Século XXI**. RIMA Ed., São Carlos, p. 95- 114, 2000.

PINTO, A. L.; MEDEIROS, R. B.; MIGUEL, A. E. S.; GOMES, W. M. Comportamento climático da bacia hidrográfica do córrego moeda, Três Lagoas/MS, no ano de 2012. **Caminhos de Geografia**, Uberlândia, v. 16, n. 53, p. 176-188, 2015.

PINTO-COELHO, R. M.; HAVENS, K. **Gestão de Recursos Hídricos em Tempos de Crise**. Porto Alegre: Artmed, 2016.

PLAA, G. L. Present status: toxic substances in the environment. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 60: p. 1010-1016, 1982.

PRÜSS-ÜSTÜN, A.; BOS, R.; GORE, F.; BARTRAM, J. Safer water, better health: costs, benefits and sustainability of interventions to protect and promote health. **World Health Organization**, Geneva, 2008.

RAHMAN, A. M. S.; MOLLA, H.; SAHA, N.; RAHMAN, A. Study on heavy metals levels and its risk assessment in some edible fishes from Bangshi River, Savar, Dhaka, Bangladesh. **Food Chemistry**, v. 134, p. 1847–1854, 2012.

RAMADE, F. **Ecotoxicologie**. Ed. Masson, Paris, 201 p, 1977.

RAHMAN, A. M. S.; MOLLA, H.; SAHA, N.; RAHMAN, A. Study on heavy metals levels and its risk assessment in some edible fishes from Bangshi River, Savar, Dhaka, Bangladesh. **Food Chemistry**, Reading, v. 134, p. 1847–1854, 2012.

RAMOS, M. A. G.; OLIVEIRA, E. S. B.; PIÃO, A. C. S.; LEITE, D. A. N. O.; ANGELIS, D. F. Water Quality Index (WQI) of Jaguari and Atibaia Rivers in the region of Paulínia, São Paulo, Brazil. **Environmental Monitoring and Assessment**, p. 188-263, 2016.

RAND, G. M.; WELLS, P. G.; MCCARTY, L. S. **Em Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment**; Rand, G. M., ed.; 2nd ed., Taylor & Francis: Washington, cap. 1, 1995.

REPULA, C. M. M.; CAMPOS, B. K.; GANZAROLLI, E. M.; LOPES, M. C.; QUINÁIA, S. P. Biomonitoramento de Cr e Pb em peixes de água doce. **Química Nova**, v. 35, n. 5, p. 905-909, 2012.

RIBO, J. M.; **Environmental Toxicology and Water Quality**, v. 12, p. 283, 1997.

RODRIGUES D. O.; SILVA S. L. R.; SILVA, M. S. R. Avaliação Ecotoxicológica Preliminar das Águas das Bacias Hidrográficas dos rios Tarumã, São Raimundo e Educandos. **Acta Amazonica**, v. 39, n. 4, p. 935-942, 2009.

ROIG, N.; NADAL, M.; SIERRA, J.; GINEBRED, A.; SCHUHMACHER, M.; DOMINGO, J. L. Novel approach for assessing heavy metal pollution and ecotoxicological status of rivers by means of passive sampling methods. **Environment International**, v. 37, n. 4, p. 671-677, 2011.

RONCO, A.; BÁEZ, M. C. D.; GRANADOS, Y. P. Conceptos Generales. In: Morales, G. C., ed. **Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas - Estandarización, Intercalibración, Resultados y Aplicaciones**. Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo: Ottawa, 2004.

ROVIRA, J.; MARI, M.; NADAL, M.; SCHUHMACHER, M.; DOMINGO, J. L. Levels of metals and PCDD/Fs in the vicinity of a cement plant: Assessment of human health risks. **Journal of Environmental Science and Health - Part A, Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering**, v. 46, p. 1075-1084, 2011.

ROVIRA, J.; NADAL, M.; DOMINGO, J. L.; TANAKU, T.; SICIU, N. A.; TREVISAN, M.; CAPRI, E.; SEGUÍ, X.; DARBRA, R. M.; SCHUHMACHER, M. Revision of Current Models for Environmental and Human Health Impact and Risk Assessment for Application to Emerging Chemicals. **The Handbook of Environmental Chemistry**, p. 1-18, 2012.

SAMPAIO, C. F. **Avaliação ambiental do rio Pardo, Brasil: ênfase para Áreas de Preservação Permanente, ecossistemas aquáticos superficiais e condições físico-químicas da água**. 2012. 101f. Dissertação (Mestrado em Enfermagem em Saúde Pública) - Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

SEGURA-MUÑOZ, S. I.; OLIVEIRA A. S.; NIKAIDO, M.; TREVILATO T. M. B.; BOCIO, A.; TAKAYANAGUI, A. M. M.; DOMINGO, J. L. Metal levels in sugar cane (*Saccharum spp.*) samples from an area under the influence of a municipal landfill and a medical waste treatment system in Brazil. **Environment International**, v. 32, p. 52-57, 2006.

SHARMA, C.; LANGER, S.; NOORANI, I. A. Population structure and some biological parameters of *Daphnia similis*, an important fish food organism. **International Journal of Fisheries and Aquatic Studies**, v. 4 (1), p. 111-114, 2016.

SIGRH (SISTEMA DE INFORMAÇÕES PARA O GERENCIAMENTO DE RECURSOS HÍDRICOS DO ESTADO DE SÃO PAULO). **Histórico CBH – Pardo**, 2010.

_____. **Histórico CBH – Pardo**, 2011.

_____. **Histórico CBH – Pardo**, 2015.

_____. **Histórico CBH – Pardo**, 2017.

SILVA, J. S., ROCHA, I. K. B. S.; FREITAS, L. C.; PEREIRA N. J.; CARVALHO NETA R. N. F.; Princípios bioéticos aplicados aos estudos ecotoxicológicos aquáticos. **Revista Bioética**, v. 23, n. 2, p. 409-418, 2015.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H.; ROCHA, O. **Produção de plâncton (fitoplâncton, zooplâncton) para alimentação de organismos aquáticos**. São Carlos, Rima, 2001, 106 p.

SOUZA-FILHO, A. P. S.; PEREIRA, A. A. G.; BAYMA, J.C. **Aleloquímico produzido pela gramínea forrageira *Brachiaria humidicola***. Planta daninha, Viçosa, v. 23, n. 1, 2005.

STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER. **8711 *Daphnia***, 22^a Edição, 2011. Disponível em <<http://www.standardmethods.org/applications/UserCenter/DownloadFile.cfm?ProductID=399>>. Acesso em: 05 nov. 2015.

_____. **8712 *Ceriodaphnia***, 22^a Edição, 2011. Disponível em <<http://www.standardmethods.org/applications/UserCenter/DownloadFile.cfm?ProductID=400>>. Acesso em: 05 nov. 2015.

STRUEWING, K. A.; LAZORCHAK, J. M.; WEAVER, P. C.; JOHNSON, B. R.; FUNK, D. H.; BUCHWALTER, D. B. Part 2: Sensitivity comparisons of the mayfly *Centroptilum triangulifer* to *Ceriodaphnia dubia* and *Daphnia magna* using standard reference toxicants; NaCl, KCl and CuSO₄. **Chemosphere**, v. 139, p. 597-603, 2015.

SUN, S.; WU, P. WANG, Y. ZHAO, X. LIU, J. ZHANG, X. The impacts of interannual climate variability and agricultural inputs on water footprint of crop production in an irrigation district of China. **Science of the Total Environment**, v. 444, p. 498-507, 2013.

TAVARES, K. P. **Avaliação da toxicidade de nanopartículas de óxido de cobre e de óxido de cromo para *Daphnia similis* e *Brachionus calyciflorus***. 2014. 50f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Tecnologia Ambiental) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2014.

TRUHAUT, R. Ecotoxicology: objectives, principles and perspectives. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 1, p. 151-173, 1977.

TUCCI, C. E. M. **Hidrologia: ciência e aplicação**. 2.ed. Porto Alegre: ABRH/Editora da UFRGS (Col. ABRH de Recursos Hídricos), v.4, 1997.

TUCCI, C. E. M. Águas urbanas. **Estudos Avançados**, v. 22, n. 63, p. 1-16, 2008.

U.S.EPA. Recognition and management of pesticide poisonings. 5 ed., 1999. Disponível em <<http://www.epa.gov/pesticide-worker-safety>> Acesso em: 05 jan. 2016.

U.S. EPA. About pesticides, 2012. Disponível em <<http://www.epa.gov/pesticides>> Acesso em: 05 jan. 2016.

VIRGA, R.H. P., GERALDO, L.P., SANTOS, F. H. Avaliação de contaminação por metais pesados em amostras de siris azuis, **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, v 27, p. 779-785, 2007.

WADHIA, K.; THOMPSON, K. C.; Trends Anal. Chem. v. 26, p. 300, 2007.

WANG, C., YEDILER, A., LIENERT, D., WANG, Z., KETTRUP, A. Toxicity evaluation of reactive dyestuffs, auxiliaries and select effluents in textile finishing industry to luminescent bacteria *Vibrio fischeri*, **Chemosphere**, n. 46, p. 339-344, 2002.

WANG, Q.; YANG, Z. Industrial water pollution, water environment treatment, and health risks in China. **Environmental Pollution**, v. 218, p. 358-365, 2016.

WEST, INC; GULLEY, D. **TOXSTAT 3.5**. University of Wyoming, 1996.

WHO(WORLD HEALTH ORGANIZATION). Air quality and health. Fact sheet N°313. Updated September, 2011. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs313/en/index.html>>. Acesso em: 14 jan. 2016.

_____. United Nations Synthesis Report on Arsenic in Drinking Water, 2014. Disponível em <http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/arsenic3/en/> Acesso em: 04 jan. 2016.

WIECZERZAK, M.; NAMIESNIK, J.; KUDLAK, B. Bioassays as one of the Green Chemistry tools for assessing environmental quality: A review. **Environment International**, v. 94, p. 341-361, 2016.

WWDR (WORLD WATER DEVELOPMENT REPORT). Water for a sustainable world, 2015. Disponível em: <<http://unesdoc.unesco.org/images/0023/002318/231823E.pdf>> Acesso em: 15 jan. 2016.

YI, Y.; YANG, Z.; ZHANG, S. Ecological risk assessment of heavy metals in sediment and human health risk assessment of heavy metals in fishes in the middle and lower reaches of the Yangtze River basin. **Environmental Pollution**, v. 159, p. 2575-2585, 2011.

YU, X.; LI, Y.; GU, X.; BAO, J.; YANG, H.; SUN, L. Laser-induced breakdown spectroscopy application in environmental monitoring of water quality: a review. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 186, p. 8969-8980, 2014.

ZAGATTO, P. A. & BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática: Princípios e Aplicações**. Editora Rima, São Carlos. p. 464, 2006.

ZAGATTO, P. A. & BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações**. ISBN 85-7656-090-9. p. 478, 2008.

ZEGURA, B.; HEATH, E.; CERNOSA, A.; FILIPIC, M. Combination of in vitro bioassays for the determination of cytotoxic and genotoxic potential of wastewater, surface water and drinking water samples. **Chemosphere**, v. 75, p. 1453-1460, 2009.

ZHANG, T. WEX, H.; RAWSON, D. M.; THOMPSON, R. S. Rapid ecotoxicological testing using transformed BF-2 cells incorporating a luminescent reporter gene. **Toxicology in Vitro**, v. 19, p. 797-803, 2005.

ZWART, D. D.; SLOOFF, W.; **Aquatic Toxicology**, v. 4, p. 129, 1983.

9. ANEXOS

Anexo 1

Centro Colaborador da Organização Mundial da Saúde
para o Desenvolvimento da Pesquisa em Enfermagem

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENFERMAGEM DE RIBEIRÃO PRETO

Avenida Bandeirantes, 3900 - Ribeirão Preto - São Paulo - Brasil - CEP 14040-902
Fone: 55 16 3602 3382 - 55 16 3602 3381 - Fax: 55 16 3602 0518
www.eerp.usp.br - eerp@edu.usp.br

Ilmo Dr. Carlos Roberto dos Santos

Diretor de engenharia da CETESB

SOLICITAÇÃO

Prezado Senhor,

Pela presente, solicito a realização de algumas análises em colaboração com a CETESB. Essas análises seriam de grande valia para a complementação dos resultados do projeto da aluna Thaís Vilela Silva, minha orientada de mestrado. Será realizado, no Laboratório de Ecotoxicologia e Parasitologia Ambiental, da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto (EERP/USP), um teste de toxicidade crônica, utilizando o método ToxTrak. Além deste ensaio, seria de extrema relevância a investigação dos efeitos tóxicos em organismos aquáticos, como *Vibrio fischeri* (MICROTOX®), *Daphnias similis* e *Ceriodaphnia dubia*, considerando que o rio Pardo é um importante recurso hídrico amplamente utilizado pela população de Ribeirão Preto e região para diversas atividades. Além disso, existem esforços de ampliarem-se os estudos da qualidade da água do rio Pardo devido a eminente necessidade de utilização dessa fonte de água para abastecimento público na cidade de Ribeirão Preto, atualmente abastecida pelo Aquífero Guarani, que está sofrendo um rebaixamento do nível de água. Desta maneira, solicito a colaboração da CETESB para a realização destes ensaios.

Ressalto que a aluna possui bolsa CNPq (Processo: 130234/2015-0), sendo que a bolsa está em vigência desde fevereiro de 2015, conforme termo de outorga anexo a esta solicitação. Destaco ainda que a aluna conta com seguro-saúde para casos de acidentes de trabalhos.

Agradeço, antecipadamente, pela atenção de V.Sa. e me coloco à disposição para quaisquer esclarecimentos adicionais necessários.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Susana Inés Segura Muñoz

Laboratório de Ecotoxicologia e Parasitologia Ambiental

Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto EERP/USP

Anexo 2

CETESB

DESPACHO

Nº

De:

Para:

E:

Data:

EDR

E / ED

18.08.2015

Referências:

Assunto:

Solicitação de colaboração técnico – científica entre EERP e a CETESB.

Senhor Diretor,

Solicito verificar a possibilidade de atender a solicitação encaminhada pela Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (EERP / USP).

A mestrand Thais Vilela Silva realizará ensaios ecotoxicológicos com *Daphnia similis*, *Ceriodaphnia dubia* e com *Vibrio fischeri*, utilizando-se da estrutura da Divisão de Laboratório de Ribeirão Preto, durante o horário de expediente da Empresa e sob a supervisão desta gerência.

No período em que estiver realizando os ensaios não irá alterar ou comprometer a rotina do trabalho.

Entendo ser uma colaboração de suma importância para esta Divisão.

Considerando-se que a aluna possui bolsa do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e, conseqüentemente seguro saúde, não visualizo nenhuma implicação dela utilizar-se da infraestrutura laboratorial para o desenvolvimento de sua pesquisa em parceria com a CETESB.

Aguardo Manifestação.

Atenciosamente,

Eduardo Angelino Savazzi
 Mé./Dr. Eduardo Angelino Savazzi
 Gerente da Divisão de Laboratório de Ribeirão Preto
 Reg nº: 47-5482 CRQ: 04231 295

A "E",
 para manifestação.

Lygia Ribeiro Ferreira
 Lygia Ribeiro Ferreira
 Gerente do Departamento de
 Laboratórios Descentralizados
 CRQ IV 04114159 - Reg. 01.1973-8

SISCAD Nº 29252/2015/1
 PI

Anexo 3

CETESB		DESPACHO	Nº 093/2015/E
Diretoria de Engenharia e Qualidade Ambiental			
e:	Para:	Data:	
E	ED	19.08.2015	
Referências:			
Assunto: Solicitação de colaboração técnico-científica entre EERP e CETESB			

Senhora Gerente,

Ouvido o Diretor de Engenharia e Qualidade Ambiental e por se tratar de empreendimento de interesse técnico da CETESB, autorizamos a colaboração com a Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e a participação da mestrandia Thais Vilela Silva na realização de ensaios de laboratório, na forma proposta.

Ressaltamos que sob qualquer hipótese a participação da mestrandia caracterizará vínculo empregatício, tratando-se de mera colaboração da CETESB.

Sugerimos que cópia da apólice do seguro-saúde da aluna seja juntada a este expediente, para fins de comprovação.

Ricardo Alberto Hermann
Assistente Executivo
Diretoria de Engenharia e Qualidade Ambiental

A EDR:

Para prosseguimento.

Atenção ao sugerido pela Diretoria

19/8/15

Sylvia Ribeiro Ferreira
Gerente do Departamento de
Laboratórios Descentralizados
CRQ IV 04114159 - Reg. 01.1973-8