UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

Avaliação e identificação da toxicidade aguda com bactéria *Aliivibrio fischeri*
nas águas superficiais da cidade de São Paulo

BRUNO DE SOUZA

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Orientadora: Profa. Dra. Elizabeth Souza
Nascimento

São Paulo

2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

Avaliação e identificação da toxicidade aguda com bactéria *Aliivibrio fischeri*
nas águas superficiais da cidade de São Paulo

BRUNO DE SOUZA

Versão corrigida da Dissertação conforme resolução CoPGr 6018

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Orientadora: Profa. Dra. Elizabeth Souza
Nascimento

São Paulo

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

S729a Souza, Bruno de
Avaliação e identificação da toxicidade aguda com bactéria
Aliivibrio fischeri nas águas superficiais da cidade de São
Paulo / Bruno de Souza. -- São Paulo, 2018.
145 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Nascimento, Elizabeth de Souza

1. Toxicologia ambiental 2. Poluição ambiental. I. T. II.
Nascimento, Elizabeth de Souza, orientador.

615.9 CDD

BRUNO DE SOUZA

Avaliação e identificação da toxicidade aguda com bactéria *Aliivibrio fischeri* nas águas superficiais da cidade de São Paulo

Comissão Julgadora da Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Profa. Dra. Elizabeth Souza Nascimento
Orientadora/presidente

Rúbia Kuno
1o. examinador

Fábio Kummrow
2o. examinador

Fabiane Dörr
3o. examinador

São Paulo, 18 de maio de 2018

SOUZA, B. **Avaliação e identificação da toxicidade aguda com bactéria *Aliivibrio fischeri* nas águas superficiais da cidade de São Paulo**. 2018. 143 f. Dissertação (Mestrado em Toxicologia e Análise Toxicológica) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

RESUMO

A poluição dos rios brasileiros é, atualmente, um grande problema para as autoridades governamentais já que a demanda dos recursos hídricos vem crescendo nos últimos anos. Os rios Tietê, Pinheiros e Tamanduateí foram de grande importância para a cidade de São Paulo em seu período de industrialização, contudo o próprio desenvolvimento industrial impactou permanentemente os mesmos. Preocupados com a saúde ambiental, órgãos fiscalizadores estaduais iniciaram forte fiscalização para coibir e responsabilizar os principais culpados. Esta política pública resultou em uma diminuição das concentrações de poluentes orgânicos e inorgânicos, porém muito pouco foi efetivamente feito com relação ao esgoto doméstico, e, como consequência, a toxicidade das águas dos rios permanece elevada. Os estudos de Avaliação e identificação da toxicidade englobam diversas metodologias reunidas em três documentos pela USEPA - Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, onde método físico-químico e testes toxicológicos são usados para identificar substâncias tóxicas, ou grupo de substâncias tóxicas que contribuem efetivamente para a toxicidade total de uma amostra. A abordagem rotineiramente utilizada baseia-se no fracionamento da amostra de acordo com suas propriedades físico-químicas: volatilidade, solubilidade e capacidade de formar complexos, ou de ser reduzida, oxidada, ionizada, entre outras. Em conjunto com os ensaios químicos, os ensaios toxicológicos, em especial o Sistema Microtox[®], contribuem na investigação da toxicidade para os rios metropolitanos Tietê, Pinheiros e Tamanduateí, que se mostrou eficaz na determinação dos grupos de compostos, sendo os compostos orgânicos apolares, orgânicos voláteis, tensoativos e as partículas, as principais fontes da toxicidade para esses rios. Embora muitas informações sobre a toxicidade tenham sido descobertas, a identificação dos compostos só pode ser realizada por análises químicas mais robustas uma vez que um grande número de substâncias, metabólitos e subprodutos de degradação são facilmente encontrados neste tipo de amostra. Mesmo sofrendo algumas modificações, deve-se incentivar o uso desta metodologia para outros rios a fim de determinar os principais toxicantes responsáveis pela toxicidade.

Palavra-chave: fracionamento químico, toxicidade, Sistema Microtox, *Vibrio fischeri*, tensoativos.

SOUZA, B. **Evaluation and identification of acute toxicity with bacteria *Aliivibrio fischeri* in surface waters of the city of São Paulo 2018**. 143 f. Dissertação (Mestrado em Toxicologia e Análise Toxicológica) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

ABSTRACT

Pollution of Brazilian rivers is currently a major problem for government authorities as demand for water resources has been increasing in recent years. Tietê, Pinheiros and Tamanduateí rivers were of great importance for the city of São Paulo during its industrialization period, however, the industrial development itself permanently impacted them. Concerned about environmental health, state supervisory bodies have begun strong enforcement to curb and hold the main culprits accountable. This public policy has resulted in a decrease in concentrations of organic and inorganic chemicals, but very little has been done in relation to domestic sewage, and as a consequence, the toxicity of the rivers remains high. The Toxicology Assessment and Identification studies encompass various methodologies gathered in three documents by the USEPA, where physico-chemical method and toxicological tests are used to identify toxic substances, or group of toxic substances that effectively contribute to the total toxicity of a sample. The routinely used approach is based on fractionation of the sample according to its physicochemical properties: volatility, solubility and chemical properties such as the ability to form complexes, or to be reduced, oxidized, ionized, among others. In conjunction with the chemical tests, the toxicological tests in particular the Microtox® System contribute to the investigation of the toxicity to the metropolitan rivers, Tietê, Pinheiros and Tamanduateí, which proved to be effective in the determination of the groups of compounds, the organic compounds being apolar, organic volatiles, surfactants and particulates, the main sources of toxicity for the studied rivers. Although much information on toxicity has been discovered, the identification of compounds can only be performed by more robust chemical analyzes since a large number of substances, metabolites, degradation byproducts are readily found in this type of sample. Even with some modifications, it is necessary to encourage the use of this methodology for other rivers in order to determine the main xenobiotics responsible for toxicity.

Key words: chemical fractionation, toxicity, Microtox System, *Vibrio fischeri*, surfactants.

Aos meus avós,

Valdenice e Vivaldo.

E *in memoriam*, Vitor Martins e
Teresa Maria de Jesus, que sempre
estiveram presentes na minha vida,
sentirei muito a sua falta.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Dr. Gilson Alves Quináglia pela confiança e amizade. Muito obrigado por todos os ensinamentos e acima de tudo pela oportunidade de desenvolver esse projeto, uma experiência única na minha vida.

À Prof. Dra. Elizabeth Nascimento, querida orientadora. Muito obrigado pela confiança, ensinamentos, paciência. Uma ótima pessoa, orientadora, professora, muito orgulho de ser seu orientado.

Aos funcionários da CETESB que me ajudaram nesta jornada. Em especial, Wálace Soares, Ivo de Freitas no qual devo muito. Ao José Francisco Viana, que dividiu pacientemente o Microtox[®] comigo, meu muito obrigado. Meu muito obrigado, também, ao Genival e Coimbra pela amizade. À Dani que sempre esteve a disposição para me ajudar e pela amizade. À Barbara que considero muito, meu muito obrigado. Levarei a amizade de todos do ELTA para sempre comigo.

Às pós-graduandas da área, Gisela Martini e Suellen Coutinho, obrigado pela amizade, por me aturar nos momentos difíceis. Lembrarei com carinho dos perrengues que passamos juntos, dessa vida de pós-graduando.

Agradeço ao setor de coleta e amostragem da CETESB e a todo da CETESB, em geral, pelo apoio, cedendo toda a infraestrutura e recursos, em especial a Sandra do Setor de Ecotoxicologia Aquática.

À minha família, minha mãe Selma, meu pai Sérgio, e minha irmã Jéssica que dão todo apoio para mim, apoio esse que é muito importante para seguir em frente e buscar meus sonhos. Às meus tios e tias com muito carinho, meus muito obrigado.

Aos meus amigos, Raphael, Rubens, Natália e Vinicius.

Aos colegas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, Aline, Laura. E à Samantha pela ajuda na burocracia. Meu agradecimento aos professores da pós-graduação pelos ensinamentos.

À CNPq e CAPES pela bolsa concedida.

Às pessoas que contribuíram de alguma forma para esse trabalho...

...MUITO OBRIGADO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Imagem da poluição do rio Tietê na região de Pirapora do Bom Jesus, causada principalmente pelo excesso de esgoto não tratado.....	47
Figura 2: Classificação das UGRHIs de acordo com suas vocações. (1) UGRHI Mantiqueira, (2) UGRHI Paraíba do Sul, (3) UGRHI Litoral Norte, (4) UGRHI Pardo, (5) UGRHI Piracicaba, Capivari e Jundiaí, (6) UGRHI Alto Tietê, (7) UGRHI Baixada Santista, (8) UGRHI Sapucaí/Grande, (9) UGRHI Mogi-Guaçu, (10) UGRHI Sorocaba/Médio Tietê, (11) UGRHI Ribeira de Iguape/Litoral Sul, (12) UGRHI Baixo Pardo/Grande, (13) UGRHI Tietê/Jacaré, (14) UGRHI Alto Paranapanema, (15) UGRHI Turvo/Grande, (16) UGRHI Tietê/Batalha, (17) UGRHI Médio Paranapanema, (18) UGRHI São José dos Dourados, (19) UGRHI Baixo Tietê, (20) UGRHI Aguapeí, (21) UGRHI Peixe, (22) UGRHI Pontal do Paranapanema.....	49
Figura 3. Consumo de água na UGRHI 6 - Alto Tietê, comparando as porcentagens de vazão de água utilizadas em cada setor.....	50
Figura 4. Mapa da UGRHI 6, alto Tietê contendo todos os pontos de coleta nesta região.....	52
Figura 5. (a) Foto da nascente do rio Tietê; (b) rio Tietê na região de Salto/SP; (c) Imagens do rio Tietê em Pereira Barreto/SP; (d) rio Tietê em São Paulo.....	53
Figura 6. Trajetória do rio Tietê pelo Estado de São Paulo.	54
Figura 7. Fotos da foz do rio Pinheiros (a) em 1929 (b) em 2015.	56
Figura 8. Localização da Bacia Hidrográfica do Tamanduateí.	57
Figura 9. Bactéria luminescente <i>Aliivibrio fischeri</i> , organismo-teste.	60
Figura 10. Mononucleotídeo de flavina ou FMN(uma flavina que funciona como grupo prostético em diversas reações de oxirredução em bioquímica). Sua forma oxidada FMN e sua forma reduzida FMNH ₂	61

Figura 11. Imagem típico de porcentagem de efeito por concentração do Microtox, em escala logarítmica.....	63
Figura 12. Imagem do fator Gamma por concentração para determinação da CE ₅₀ e CE ₂₀	64
Figura 13. Equipamento para realizar os testes de toxicidade.....	65
Figura 14. Fluxograma para a Fase 1 do TIE.	67
Figura 15. Ilustração das etapas que compõem a extração em fase sólida, que compreendem: condicionamento, adição da amostra, lavagem para remoção de interferentes e eluição dos analitos de interesse.....	73
Figura 16. Estruturas químicas da resina de preenchimento do cartucho de SPE. MCX (cartuchos misto de troca iônica de fase reversa) HLB (cartuchos de equilíbrio hidrofílico-lipofílico de fase reversa) e MAX (cartuchos mistos de troca aniônica de fase reversa).....	74
Figura 17. Região de interface de uma partícula de sílica funcionalizada com uma cadeia de octadecil (18 carbonos), uma estrutura extremamente apolar.	75
Figura 18. Concentrador de amostras utilizado na evaporação de solventes.	80
Figura 19. Sistema montado para extração em fase sólida (SPE).	81
Figura 20. Sistema montado para aeração da amostra, que consiste na ligação de 7 divisores de ar, ligados entre si. Uma mangueira adaptada com um filtro é ligada diretamente à linha de ar comprimido e em cada saída do divisor é conectado uma mangueira que por sua vez é colocada na amostra.	82
Figura 21. Sistema de filtração a vácuo utilizado para filtrar a amostra dos rios Tietê, Pinheiros e Tamanduateí.....	87
Figura 22. Esquema de eluição utilizando 10 mL de metanol após a eluição da amostra em pH ácido.	88
Figura 23. Ilustração da etapa de eluição dos composto retidos na coluna HLB.....	89

Figura 24. Esquema das misturas de solvente utilizadas para a eluição dos compostos retidos na coluna C18, onde a fração A é composta por 10 mL de hexano, a fração B é composta por 10 mL de diclorometano/hexano na proporção de 4:1 (v v ⁻¹) e a fração C corresponde a uma mistura de metanol/diclorometano (DCM) na proporção de 9:1 (v v ⁻¹).	90
Figura 25. Fluxograma da execução do condicionamento da coluna SPE, C18 e HLB e a retirada do branco da coluna. Este procedimento antecede a extração em fase sólida e na etapa 2 o pH da água ultra purificada é o mesmo pH em que se encontra a amostra.	93
Figura 26. Fluxograma de extração em fase sólida (SPE) e filtração referente ao branco. A coluna deve ser condicionada conforme indicado a seguir anterior.	94
Figura 27. Fluxograma de extração da amostra e da eluição da coluna e filtração nas três faixas de pH trabalhados.	95
Figura 28. Fluxograma da adição de tiosulfato de sódio na amostra e no branco executados no mesmo instante. A adição de tiosulfato é crescente em cada fração.	96
Figura 29. Fluxogramas de execução da adição do EDTA na amostra e no branco que foram executadas no mesmo instante. A adição do EDTA é crescente em cada fração.	97
Figura 30. Carta controle para a solução aquosa de (a) fenol, (b) dicromato de potássio e (c) sulfato de zinco	99
Figura 31. Toxicidade expressa em CE ₂₀ no sistema Microtox® em função do tempo, (a) rio Pinheiros, (b) rio Tietê e (c) rio Tamanduateí.	102
Figura 32. Gráfico pluviométrico da média mensal da UGHRI 6 – Alto Tietê do ano de 2016.	104
Figura 33. Teste de toxicidade aguda em 5 e 15 minutos para as águas do rio Jaguari.	104
Figura 34. Dendrograma para os parâmetros característicos de contaminação por esgoto urbano para o rio Tietê usando análise de agrupamento pelo método de Ward e distâncias euclidianas.	106

Figura 35. Dendrograma para os parâmetros característicos de contaminação por esgoto urbano para o rio Tamanduateí usando análise de agrupamento pelo método de Ward e distâncias euclidianas.....	106
Figura 36. Dendrograma para os parâmetros característicos de contaminação por esgoto urbano para o rio Pinheiros usando análise de agrupamento pelo método de Ward e distâncias euclidianas.	107
Figura 37. Teste de toxicidade aguda do reagente EDTA usado para complexar metais	109
Figura 38. Resultado de toxicidade da água do rio Jaguarí fortificada com chumbo na concentração de 10 mg L ⁻¹	110
Figura 39. Teste de toxicidade aguda para o branco fortificado com chumbo 10 mg L ⁻¹ e EDTA adicionado em diferentes concentrações.	111
Figura 40. Teste de toxicidade aguda com EDTA na amostra do rio Pinheiros.....	112
Figura 41. Teste de toxicidade aguda com EDTA na amostra tóxica do rio Tietê.....	113
Figura 44. Teste de toxicidade do tiosulfato de sódio em três concentrações diferentes.	115
Figura 43. Teste de toxicidade para determinar a CE ₂₀ do branco fortificado com prata 10 mg L ⁻¹ após 5 e 15 minutos de exposição.	116
Figura 44. Teste de toxicidade aguda com branco fortificado com prata em diferentes concentrações de tiosulfato de sódio.....	117
Figura 45. Teste de toxicidade aguda com amostras do (a) rio Pinheiros e (b) Tietê em diferentes concentrações de tiosulfato de sódio	117
Figura 46. Resultados de gradação de pH do rio Tietê para os limites da faixa de trabalho do organismo-teste e os respectivos brancos.....	119
Figura 47. Resultados de gradação de pH do rio Pinheiros para os limites da faixa de trabalho do organismo-teste e os seus respectivos brancos.....	120

Figura 48. Valores médios (n=2; n=1, pH Básico) de CE ₂₀ em 15 minutos de exposição da água bruta do rio Tietê e da mesma amostra filtrada em uma membrana 0,45 µm de porosidade, pH da amostra e a data da execução da manipulação.....	122
Figura 49. Valores médios (n=2; n=1, pH Básico) de CE ₂₀ em 15 minutos de exposição da água bruta do rio Tamanduateí e da mesma amostra filtrada em uma membrana 0,45 µm de porosidade.	123
Figura 50. Valores médios (n=2; n=1, pH Básico) de CE ₂₀ em 15 minutos de exposição da água bruta do rio Pinheiros e da mesma amostra filtrada em uma membrana 0,45 µm de porosidade.	124
Figura 51. Curva teórica de fator de retenção em função do pH da amostra e as faixas recomendáveis de trabalho das duas fases estacionárias, C18 e Oasis® HLB.	127
Figura 52. Resultados de toxicidade obtidos após realizar a extração em fase sólida para a amostra dos rios(a) Tietê, (b) Pinheiros e (c) Tamanduateí.	128
Figura 53. Efeito tóxico dos brancos da coluna realizando no início, após o condicionamento da coluna.	131
Figura 54. Valores de CE ₂₀ em porcentagem das amostras dos três rios estudados.....	132
Figura 55. Curva dose-resposta para o metanol puro obtida pelo sistema Microtox® em 15 minutos de exposição.....	133
Figura 56. Teste toxicológico para a solução de fenol em metanol na concentração de 47,5 mg L ⁻¹ . A CE ₂₀ calculada é de 28,32% com intervalo de confiança de 25,94-30,91.....	134
Figura 57. Resultados de toxicidade apresentados anteriormente, porém convertidos em unidades tóxica, UT ₂₀	136
Figura 58. Resultados médios expressos em termos de unidade tóxica (UT ₂₀) em 15 minutos de exposição para o rio Pinheiros.	138

Figura 59. Resumo com os valores de CE_{20} em porcentagem de todas as manipulações realizadas na amostra do rio Pinheiros, filtração aeração, extração em fase sólida, eluatos nas três faixas de pH trabalhadas.....	139
Figura 61. Resultados médios expressos em termos de unidade tóxica (UT_{20}) em 15 minutos de exposição para o rio Tamanduateí.....	140
Figura 61. Resumo com os valores de CE_{20} em porcentagem de todas as manipulações realizadas na amostra do rio Tamanduateí, filtração aeração, extração em fase sólida, eluatos nas três faixas de pH.	141
Figura 62. Resultados médios expressos em termos de unidade tóxica (UT_{20}) em 15 minutos de exposição. Somente as manipulações que reduziram a toxicidade da amostra do rio Tietê foram colocadas.	143
Figura 63. Resumo com os valores de CE_{20} em porcentagem de todas as manipulações realizadas na amostra do rio Tietê, filtração aeração, extração em fase sólida, eluatos nas três faixas de pH.	144

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Grupo de variáveis da qualidade da água monitoradas pela CETESB.....	51
Tabela 2.Exemplos de possível interpretação para os testes da Fase1	68
Tabela 3. Localização geográfica dos pontos de coleta para os três rios, Tietê, Pinheiros e Tamanduateí utilizados neste trabalho.	78
Tabela 4.Cronograma de coleta realizado.	78
Tabela 5.Volumes da solução de EDTA 15,0 g L ⁻¹ utilizados no teste de quelação com agente complexante, juntamente com a concentração final de EDTA adicionados	85
Tabela 6. Volumes de solução de tiosulfato de sódio (Na ₂ S ₂ O ₃)1,62 g L ⁻¹ adicionado às amostras e aos brancos com as concentrações.....	86
Tabela 7. Solventes usados na extração em fase sólida, com as respectivas proporções em cada fase estacionária.....	91
Tabela 8. Valores de CE20 em porcentagem para os rios Tietê, Pinheiros e Tamanduateí.	100
Tabela 9. Cronograma com a informações pluviiais nas últimas 24 horas	103
Tabela 10. Valores de significância em 1 extremidade (probabilidade associada) para o teste <i>t</i> de Student para o rio Pinheiros.	113
Tabela 11. Valores de significância em 1 extremidade (probabilidade associada) para o teste <i>t</i> de Student para o rio Tietê	114
Tabela 12. Valores de significância em 1 extremidade (probabilidade associada) para o teste <i>t</i> de Student.....	118

Tabela 13. Resultados estatísticos referente ao teste <i>t</i> de <i>Student</i> para amostras emparelhadas, comparando os valores médios de efeito tóxico (5 e 15 minutos) dos pares: amostra e gradação em diferentes valores de pH.....	120
Tabela 14. Comparação dos resultados de toxicidade (CE ₂₀ em 15 min.) entre amostra bruta com as frações filtradas em meio ácido, básico e neutro do Rio Tietê.....	123
Tabela 15. Comparação dos resultados de toxicidade (CE ₂₀ em 15 min.) entre amostra bruta com as frações filtradas em meio ácido, básico e neutro do Rio Tamanduateí.....	124
Tabela 16. Comparação dos resultados de toxicidade (CE ₂₀ em 15 min.) entre amostra bruta com frações filtradas em meio ácido, básico e neutro do Rio Pinheiros.....	125
Tabela 17. Efeito tóxico dos brancos após a filtração em pH ácido, básico e inicial na concentração máxima permitida pelo Sistema Microtox [®] , 81,9%.....	126
Tabela 18. Resultado dos valores de toxicidade, efeito tóxico, no tempo de exposição de 5 e 15 minutos. Utilizando o protocolo com uma serie de nove diluições visando determinar a CE ₂₀	134
Tabela 19. Resultados de toxicidade (CE ₂₀ em 15 minutos) do metanol de lavagem usado após o procedimento de aeração.....	135
Tabela 20. Resultados de CE ₂₀ (%) em 15 minutos de exposição para o rio Pinheiros o valor do intervalo de confiança (IC) e o efeito em porcentagem na concentração máxima de 81,9%.....	137
Tabela 21. Resultados de CE ₂₀ (%) em 15 minutos de exposição para o rio Tamanduateí o valor do intervalo de confiança (IC) e o efeito em porcentagem na concentração máxima de 81,9%.....	140
Tabela 22. Resultados de CE ₂₀ (%) em 15 minutos de exposição para o rio Tietê o valor do intervalo de confiança (IC) e o efeito em porcentagem na concentração máxima de 81,9%.....	142
Tabela 23. Parâmetros físico-químicos de campo, compostos orgânicos voláteis, ecotoxicológicos e químicos referente ao ano de 2016 do rio Tietê.....	158

Tabela 24. Parâmetros físico-químicos de campo, compostos orgânicos voláteis, ecotoxicológicos e químicos referente ao ano de 2016 do rio Tamanduateí	159
---	-----

Tabela 25. Parâmetros físico-químicos de campo, compostos orgânicos voláteis, ecotoxicológicos e químicos referente ao ano de 2016 do rio Pinheiros	161
---	-----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

USEPA	Agência de proteção ambiental dos Estados Unidos
TIE/AIT	Avaliação e identificação da toxicidade
CETESB	Companhia ambiental do Estado de São Paulo
ONU	Organização da Nações Unidas
PAH	Hidrocarboneto policíclico aromático
PCB	Bifenila policlorada
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
UGRHI	Unidade de Gerenciamento de Recursos hídricos
PIB	Produto Interno Bruto
DBO	Demanda bioquímica de oxigênio
DAEE	Departamento de água e energia elétrica do Estado de São Paulo
CPTM	Companhia Paulista de Trens Metropolitanos
FMNH ₂	Riboflavina 5-fosfato
FMN	Mononucleotídeo de flavina
CE ₂₀	Concentração efetiva capaz de reduzir a luminescência em 20%
EDTA	Etilenodiaminotetracético
SPE	Extração em fase sólida
SAX	Cartucho de troca aniônica
SCX	Cartucho de troca catiônica
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta eficiência
GC	Cromatografia gasosa
ICP-OES	Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente
ICP-MS	Espectrometria de massa por plasma acoplado indutivamente
GFAAS	Espectrometria de absorção atômica em forno de grafite
FAAS	Espectrometria de absorção atômica de chama
MCX	Coluna misto de troca catiônica de fase reversa
HLB	Coluna balanceada hidrofílico-lipofílico de fase reversa
MAX	Coluna misto de troca aniônica de fase reversa
SAO	Solução de Ajuste Osmótico

DCM	Diclorometano
IC	Intervalo de confiança
Und	Unidade
Unt	Unidade de turbidez
NIST	Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia
LAS	Sulfonato de alquilbenzeno linear
UT	Unidade tóxica
AEO	Álcoois polietoxilados
NPEO	Nonilfenol polietoxilado
TIET	Rio Tietê
PINH	Rio Pinheiros
TAMT	Rio Tamanduateí

LISTA DE SÍMBOLOS

R	Cadeia carbônica longa (alcano)
I_0	Luminescência do controle em tempo inicial
t	Tempo
Fc	Fator de correlação
$f(t)$	Fator de correlação em um determinado tempo
$I^o_{(t)}$	Leitura da luminescência inicial do branco em um determinado tempo
$I'_{(t)}$	Leitura da luminescência inicial da cubeta do teste em um determinado tempo
$\%E_{(t)}$	Porcentagem de efeito em um determinado tempo
c	Concentração
Γ	Gamma
a	Coeficiente linear
b	Coeficiente angular
A80	Fração da amostra correspondente aos 80 mL iniciais
A170	Fração da amostra correspondente aos 170 mL iniciais
B70	Fração do branco correspondente aos 70 mL iniciais
H_1	Hipótese alternativa
H_0	Hipótese nula
p	Probabilidade associada/significância

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	43
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	45
2.1	A questão da Água.....	45
2.1.1	No Brasil	45
2.1.2	Poluição Hídrica.....	46
2.2	Hidrografia do Estado de São Paulo	48
2.2.1	URGHI 6: Alto Tietê.....	49
2.2.2	Rio Tietê.....	53
2.2.3	Rio Pinheiros.....	55
2.2.4	Rio Tamanduateí	57
2.3	Toxicologia Ambiental	58
2.3.1	Aspectos gerais	58
2.3.2	Toxicologia ambiental e a Saúde humana	59
2.3.3	Sistema Microtox®	60
2.4	Avaliação e identificação da toxicidade	66
2.4.1	Fase 1: Fase da Caracterização	66
2.4.2	Fase 2: Fase de Identificação	69
2.4.3	Fase 3: Fase da Confirmação	70
2.5	Fracionamento Químico	71
2.5.1	Extração em fase sólida.....	72
2.5.2	Filtração, mudança no pH e outras manipulações	75
3	OBJETIVOS.....	77
3.1	Gerais.....	77
3.2	Específicos.....	77
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	78
4.1	Amostragem e Coleta	78
4.2	Materiais	79
4.2.1	Reagentes	79
4.2.2	Equipamentos.....	80
4.2.3	Softwares.....	83
4.3	Procedimentos Experimentais	83
4.3.1	Protocolo de execução do ensaio de toxicidade aguda sistema Microtox®	83
4.3.1.1	Reconstituição da bactéria liofilizada	83
4.3.1.2	Ensaio de toxicidade aguda com substância de referência	83
4.3.1.3	Ensaio de toxicidade aguda seriada da amostra	84
4.3.1.4	Ensaio de toxicidade aguda em dose única	84

4.3.2	Protocolos para avaliação e identificação da toxicidade	85
4.3.2.1	Adição de EDTA	85
4.3.2.2	Adição de tiosulfato de sódio	85
4.3.2.3	Gradação do pH	86
4.3.2.4	Ajuste de pH e Filtração a vácuo	86
4.3.2.5	Extração em fase sólida.....	88
4.3.2.6	Aeração	90
4.3.2.7	Recuperação da toxicidade a partir do eluato.....	91
4.4	Fluxograma Experimental	92
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	98
5.1	Qualidade sistema Microtox®	98
5.2	Toxicidade inicial dos rios e outros parâmetros	100
5.3	Avaliação e identificação da toxicidade	108
5.3.1	EDTA.....	108
5.3.2	Tiosulfato de sódio	114
5.3.3	Gradação do pH	119
5.3.4	Ajuste de pH e Filtração à vácuo	121
5.3.5	Extração em fase sólida.....	126
5.3.6	Aeração	131
5.3.7	Recuperação da toxicidade a partir do eluato.....	136
6	CONCLUSÕES	145
7	RECOMENDAÇÕES	147
	REFERÊNCIAS	148
	ANEXOS	158

1 INTRODUÇÃO

O meio ambiente é umas das grandes preocupações governamentais e de saúde do último século, sendo que muitos problemas decorrentes das suas alterações estão sendo detectados em diferentes níveis. Em termos de saúde humana, há um grande aumento de casos de problemas respiratórios provocados pela poluição (ARBEX et al., 2012). Na biota, um caso que vem chamando a atenção mundial são os interferentes endócrinos (WHO, 2012) que causam alterações fisiológicas ou morfológicas em baixas concentrações, tais como alteração na proporção de machos e fêmeas de determinados grupos ecológicos, desenvolvimento de características femininas em peixes machos (WHO, 2012), entre outras.

Neste cenário, a água é um importante veículo a ser contemplado em discussões e estudos científicos. Sua importância é incontestável para o desenvolvimento humano e, acima de tudo, para a manutenção da vida no planeta. A água doce (água de rios, lagos, lençóis subterrâneos com uma salinidade próxima de zero) representa apenas 2,5% do total de água existente no planeta, sendo que 0,3% são facilmente disponíveis para o consumo, ou seja, águas de rios, riachos, córregos, lagoas, lagos e represas (CAMPOS, 2012). Esta facilidade em obter este recurso também faz destes veículos um dos mais impactados por ação antropogênica, principalmente nos grandes centros urbanos.

Outro ponto importante na dinâmica dos recursos hídricos é que existe um grande desperdício de água potável, tanto em processos industriais e agrícolas, quanto pela população. A gestão dos recursos hídricos torna-se necessária no contexto empresarial e governamental para tornar o uso da água mais consciente.

O rio Tietê e seus afluentes vêm sendo, há tempos, utilizados como corpos receptores do esgoto, não somente da cidade de São Paulo, como de toda a região metropolitana. Com o aumento populacional e a falta de políticas públicas sanitárias o rio se deteriorou perdendo suas características, tais como cachoeiras e corredeiras em seu percurso e se adequando à nova realidade. Outras mudanças na paisagem do rio Tietê e seus principais afluentes foram implantadas visando minimizar problemas de enchentes na grande São Paulo. Todas estas modificações físicas ao longo de anos e toda a carga de esgoto lançada modificaram profundamente o rio Tietê na região metropolitana (PAGANINI, 2008).

A contaminação por poluentes, urbanos, industriais e agrícolas, vem sendo monitorada constantemente pelas agências ambientais responsáveis. A crescente demanda dos recursos hídricos, tanto pelos processos industriais quanto pela população, é uma questão

importantíssima, uma vez que, atualmente, a poluição presente altera a dinâmica socioeconômica local, além da diminuição da biodiversidade.

A expressão da toxicidade é caracterizada pela exposição (magnitude, duração, frequência) e pelas propriedades físico-químicas e suas interações com a biota, ou seja, suscetibilidade dos sistemas biológicos àquele poluente. O dano que essas substâncias tóxicas podem causar na população vai depender da extensão da contaminação, do contato com o tóxicos, de sua toxicidade e persistência (OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2008).

Os ensaios ecotoxicológicos têm sido uma ferramenta muito importante na avaliação da toxicidade em amostras ambientais e no monitoramento da qualidade da água. Ensaio de bioluminescência (Sistema MICROTOX®), ensaios com algas *Selenastrum capricornutum*, microcrustáceos *Ceriodaphnia dubia* e peixes *Pimephales promelas* são amplamente utilizados em rotinas para se avaliar e monitorar a qualidade das águas e o impacto da poluição sobre a flora e fauna. Todos estes dados, levantados a partir de estudos ecotoxicológicos são usados para definir limites de exposição para proteger a biota.

Em 1991 a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) publicou um protocolo visando não somente a avaliação da toxicidade, mas também na sua identificação, conhecido como *Toxicity Identification Evaluation* (TIE) ou Avaliação e Identificação da Toxicidade (AIT). Este documento baseia-se em obter informações sobre o composto, ou grupo de compostos, que causam toxicidade, alterando alguma propriedade química inerente àquele. Desta forma, ensaios toxicológicos podem ser feitos nas frações obtidas a fim de determinar os compostos que causam efeito.

O TIE, usado por entidades ambientais como a Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB), torna-se uma ferramenta importantíssima no combate à poluição e aponta caminhos para políticas de gestão dos recursos, não somente hídricos (foco do trabalho), mas também em qualquer compartimento ambiental: solo, sedimento e ar. Trabalhos vêm sendo feitos neste sentido e o laboratório de ecotoxicologia dentro da CETESB tem protocolos de avaliação e identificação da toxicidade para *Ceriodaphnia dubia*, e já realizou alguns trabalhos sobre o tema, tais como: “Avaliação e Identificação da Toxicidade Crônica no Canal de Fuga II”(BURATINI; ARAGÃO, 2007), “Avaliação e Identificação da Toxicidade no Rio Baquirivu-Guaçu”(BURATINI, 2005).

Expandir esta metodologia para outros organismos como a bactéria *Aliivibrio fischeri* e aplicá-la ao ensaio MICROTOX®, que é um ensaio toxicológico rápido e muito eficiente para amostras ambientais impactadas, faz-se necessário como uma forma de aprofundar o trabalho

já realizado e aprimorá-lo com técnicas mais modernas de fracionamento químico e separações químicas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A questão da Água

O planeta Terra comporta imensa variedade de organismos vivos, e a água é o elemento base para todos eles. Não existiria vida em nosso planeta se não houvesse água. Aspectos econômicos também estão envolvidos neste recurso e, hoje em dia, muitos processos industriais e agrícolas implicam no consumo direto de água. Atividades humanas como turismo, lazer e geração de energia são também exemplos de seu uso.

2.1.1 No Brasil

Como previsto na legislação brasileira e na Agenda 21, a água é um bem a que todos devem ter direito, todos devem ter água potável em quantidades suficientes, com custo acessível e facilmente disponível para uso doméstico ou pessoal. Em âmbito mundial, cada sociedade possui uma relação peculiar com a água, que reflete a diversidade de valores e de experiências acumuladas. Como referência cultural e social, a água encontra grande expressão nas artes, nas religiões, na mitologia, no folclore, na ciência e na política. E muitas vezes é utilizada como instrumento de dominação em sociedades (BRASIL, 2006).

Da água doce existente em nosso planeta, 68,9% encontra-se nas geleiras nos polos do planeta, e regiões montanhosas, 30% são águas subterrâneas, 0,9% contempla umidade de solo e pântanos e 0,3% constitui a porção superficial da água doce presente em rios e lagos (SHIKLOMANOV; RODDA, 2003). Esses 0,3% não estão distribuídos uniformemente pelo planeta. A distribuição está relacionada com a presença de ecossistemas que compõe os diversos territórios, sendo que uns podem apresentar uma maior abundância em relação a outros (BRASIL, 2006).

De acordo com a Organização das Nações Unidas – ONU (2010), uma pessoa precisa de 50 a 100 litros de água por dia, uma média de 27.375 litros $\text{hab}^{-1} \text{ano}^{-1}$, para suas necessidades mais básicas: beber, cozinhar, tomar banho, lavar roupas e utensílios. Países como Kuwait, Emirados Árabes, Ilhas Bahamas e Faixa de Gaza possuem uma disponibilidade hídrica de 10

a 66 litros $\text{hab}^{-1} \text{ano}^{-1}$, enquanto que países como Canadá, Rússia, Guianas e Gabão possuem uma média superior a 100.000 litros $\text{hab}^{-1} \text{ano}^{-1}$ (SOUZA, 2010).

O aumento populacional, e a consequente a poluição provocada, o consumo excessivo e o alto desperdício contribuem para redução da disponibilidade da água. A população mundial triplicou no século XX, e o volume de água utilizada aumentou aproximadamente nove vezes neste mesmo período. Desta forma, o crescimento populacional e o consumo de água apresentaram um crescimento incompatível com a quantidade total de água presente no planeta (BRASIL, 2006).

2.1.2 Poluição Hídrica

Nas últimas décadas, a poluição das águas vem se tornando cada vez mais considerável, chegando a ponto de comprometer parte deste recurso. As características que fazem da água um meio ideal para o surgimento da vida é também responsável por deixá-la vulnerável à poluição. A poluição pode vir de duas fontes: naturais e antropogênicas, e é caracterizada quando a água adquire substâncias, partículas e microrganismos que a tornam impróprias para o consumo humano, ou para a produção de alimentos, ou impacta o meio ambiente (RAND, 1995).

Os poluentes podem vir de diversos compartimentos ambientais e atingirem o corpo d'água. A poluição atmosférica introduz uma grande quantidade de poluentes gasosos como o dióxido de carbono, dióxido de enxofre ou amônia, o que acaba por interferir no equilíbrio químico de espécies naturalmente presentes. Outra fonte de poluição das águas são os rejeitos industriais que são lançados diretamente nos rios. Este tipo de poluição pode alterar propriedades físico-químicas da água, ou pode conter alguma espécie inorgânica, ou orgânica muito tóxica para a vida, causando um desequilíbrio ecológico (RAND, 1995). O esgoto doméstico é caracterizado pela presença de substâncias provenientes de residências, edifícios comerciais, compondo-se essencialmente de água de banho, urina, fezes, detergentes e águas de lavagem (PAGANINI, 2008). É uma importante fonte poluidora dos rios nas regiões urbanizadas, por conter uma grande quantidade de produtos químicos e matéria orgânica que causa um desequilíbrio no ecossistema, dentre outros problemas. A figura 1 ilustra a poluição por esgoto doméstico sem tratamento, onde se observa uma camada espessa de espuma cobrindo o rio Tietê na região de Pirapora do Bom Jesus (54 km de São Paulo) (SCHIAVONI, 2015).

Figura 1. Imagem da poluição do rio Tietê na região de Pirapora do Bom Jesus, causada principalmente pelo excesso de esgoto não tratado.

Fonte: WHITAKER (2015).

A contaminação direta ou indireta dos poluentes orgânicos presentes nos produtos industrializados ou nos processos industriais contribuem fortemente para a toxicidade da água (RAND, 1995).

Os praguicidas são substâncias específicas usadas para exterminar ou controlar uma determinada praga, e com isso podem atingir comunidades presentes no ecossistema, e quimicamente podem ser complexas moléculas orgânicas, ou uma simples substância inorgânica (RAND, 1995). Estas substâncias, muitas vezes, são lixiviadas pela água da chuva, e carregadas para os rios e lagos próximos, causando uma poluição regional, ou também podem percolar o solo, atingindo as águas subterrâneas. Vale ressaltar que o solo e sedimentos podem ser depósitos de poluentes, e que estes compartimentos estão em equilíbrio entre si.

No meio ambiente, um composto pode persistir um determinado tempo sem sofrer qualquer transformação, e este período é expresso em termos de meia-vida, definida como o tempo para diminuir pela metade a concentração inicial do poluente. As transformações sofridas pelos poluentes podem ser abióticas ou bióticas. As reações de transformação abióticas predominantes na água são a hidrólise (reação com moléculas de água), oxirredução (reações onde ocorrem transferência de elétrons) e fotólise (reações mediadas pela presença

de fótons de luz). Já as transformações bióticas são mediadas por organismos vivos presentes no solo ou na água, que por mecanismos bioquímicos transformam estes poluentes em substâncias mais solúveis em água o que possibilita uma fácil degradação (RAND, 1995; OGA; CAMARGO BATISTUZZO, 2008)

Os ecossistemas são muito adaptáveis, mesmo uma substância exógena pode ser depurada e o sistema atingir um novo equilíbrio sem acarretar grandes danos à biota. Porém, essa capacidade não é infinita, podendo afetar a sobrevivência dos organismos presentes e causar um desequilíbrio para o sistema. Espécies de ecossistemas diferentes podem ser afetadas se tiverem uma ligação com o ambiente poluído, como, por exemplo, pela cadeia alimentar, expondo outros organismos à substância tóxica (MANAHAN, 2013).

2.2 Hidrografia do Estado de São Paulo

O Estado de São Paulo possui em área de aproximadamente 248.000 km² e está localizado na região Sudeste no Brasil, representando 3% do território nacional e faz divisas com os Estados de Minas Gerais ao Norte, Paraná ao Sul, Mato Grosso do Sul ao oeste e Rio de Janeiro ao leste. O Estado possui 645 municípios, divididos em 4 Regiões Metropolitanas: (1) Região Metropolitana de São Paulo, (2) Região Metropolitana da Baixada Santista, (3) Região Metropolitana de Campinas, (4) Região Metropolitana do Vale do Paraíba e Litoral Norte. Hoje, (Estimativa populacional referente ao 15/09/2015 do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE) residem no estado de São Paulo, 44,3 milhões de habitantes, cerca de 22% de toda a população brasileira. Na cidade de São Paulo são 12 milhões de habitantes (IBGE, 2015).

Em termos hidrológicos, a região de São Paulo está localizada na Bacia Hidrográfica do Rio Paraná, tendo como limites naturais os rios: Grande, Canoas, Pardo, da Ribeira do Iguape, Itapirapuã, Itararé, Paranapanema e Paraná, além do Oceano Atlântico. Outros rios importantes no Estado de São Paulo, incluem; Tietê, Turvo, Pardo, do Peixe, Paraíba do Sul e Piracicaba.(BIBLIOTECA VIRTUAL, 2016)

A Lei nº 9.034/1994 estabeleceu a divisão por vocação em 22 Unidades de Gerenciamento de Recursos Hídricos (UGRHI) (Figura 2), no plano estatual de recursos hídricos. Entende-se por vocação o uso predominante das águas que são destinadas à agropecuária, de conservação, em processo de industrialização e industrial (CETESB, 2014).

Figura 2: Classificação das UGRHs de acordo com suas vocações. (1) UGRHI Mantiqueira, (2) UGRHI Paraíba do Sul, (3) UGRHI Litoral Norte, (4) UGRHI Pardo, (5) UGRHI Piracicaba, Capivari e Jundiaí, (6) UGRHI Alto Tietê, (7) UGRHI Baixada Santista, (8) UGRHI Sapucaí/Grande, (9) UGRHI Mogi-Guaçu, (10) UGRHI Sorocaba/Médio Tietê, (11) UGRHI Ribeira de Iguape/Litoral Sul, (12) UGRHI Baixo Pardo/Grande, (13) UGRHI Tietê/Jacaré, (14) UGRHI Alto Paranapanema, (15) UGRHI Turvo/Grande, (16) UGRHI Tietê/Batalha, (17) UGRHI Médio Paranapanema, (18) UGRHI São José dos Dourados, (19) UGRHI Baixo Tietê, (20) UGRHI Aguapeí, (21) UGRHI Peixe, (22) UGRHI Pontal do Paranapanema.

Fonte: CETESB (2014).

As principais UGRHs do Estado de São Paulo encontram-se impactadas. Grande parte da população paulista não tem seu esgoto atendido pelo sistema de tratamento. Por se tratar de uma região altamente industrializada, muitos efluentes industriais também não apresentam um tratamento devidamente adequado, gerando mais impacto nas bacias hidrográficas do Estado. Além das atividades industriais, a agricultura também representa uma parcela importante na contaminação, com a utilização de agrotóxicos e fertilizantes (CETESB, 2014).

2.2.1 URGHI 6: Alto Tietê

A URGHI 6 – Alto Tietê inclui mais da metade da população do Estado de São Paulo compreende a região metropolitana de São Paulo, e é composta por 34 municípios. Seu principal rio é o Tietê, que, abrangendo sua nascente até a barragem do Reservatório de

Pirapora, apresenta cerca de 133 km de extensão. São constituintes da URGHI 6 os seguintes corpos hídricos: rios Tietê, Claro, Paraitinga, Biritiba-Mirim, Jundiaí, Taiaçupeba-Mirim, Embu-Guaçu, Embu-Mirim, Cotia, Baquirivu-Guaçu, Tamanduateí, Pinheiros, Juqueri, Grande, das Pedras, Ribeirão do Campo, Ponte Nova, Biritiba, Taiaçupeba, Pedro Beicht, Cachoeira da Graça, Juqueri, Edgard de Souza, Pirapora, Águas Claras, e córregos Aricanduva e Cabuçu, Reservatórios Billings e Guarapiranga (CAMPOS, 2012; CETESB, 2014).

Nesta região concentra-se grande parte da riqueza do país, cerca de 15% do Produto Interno Bruto (PIB) brasileiro, pois nela estão instaladas grandes multinacionais do ramo farmacêutico, automotivo, químico, setores de telecomunicações, transportes, serviços, centros universitários de grande porte, e centros financeiros. A distribuição dos recursos hídricos no Estado é ilustrada na figura 3. Grande parte dos recursos hídricos nesta URGHI está destinada aos processos industriais com 79%, uma vazão de $68,5 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$. Os outros usos, como o urbano que se resume praticamente ao uso doméstico e a irrigação, correspondem a 17% e 4% com vazões de $14,33 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ e $3,59 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$, respectivamente (CETESB, 2014).

Figura 3. Consumo de água na URGHI 6 - Alto Tietê, comparando as porcentagens de vazão de água utilizadas em cada setor.

Fonte: Adaptado de CETESB (2014).

Os corpos hídricos da UGRHI 6 – Alto Tietê, perderam suas vazões ao longo do tempo, devido a intenso processo de urbanização (CAMPOS, 2012), à implementação do sistema Tietê-Billings, à impermeabilização do solo, às reversões de bacias circunvizinhas e o lançamento do esgoto diretamente no corpo hídrico, que levaram à perda das características naturais.

Considerada como alta vulnerabilidade à pressão antrópica pelo órgão de monitoramento ambiental (CETESB, 2014), esta unidade tem preocupado as entidades ambientais no Brasil. A CETESB monitora a qualidade das águas por meio dos ensaios observados na tabela 1.

Tabela 1. Grupo de variáveis da qualidade da água monitoradas pela CETESB.

Grupo	Principais Variáveis	Outras Variáveis
Químico	Alumínio Dissolvido, Alumínio Total, Carbono Orgânico Total, Chumbo Total, Cloreto Total, Cobre Dissolvido, Cobre Total, Cromo Total, DBO (5, 20) demanda bioquímica de oxigênio, Ferro Dissolvido, Ferro Total, Fósforo Total, Manganês Total, Mercúrio Total, Níquel Total, Nitrogênio Amoniacal, Nitrogênio de Kjeldahl, Nitrogênio-Nitrato, Nitrogênio-Nitrito, Oxigênio Dissolvido, pH, Potássio, Sódio, Sódio Dissolvido Total, Sódio Total, Substâncias tensoat. Reagem c/ Azul de Metileno, Turbidez, Zinco Total	Alcalinidade Total, Arsênio Total, Boro Total, Carbono Orgânico Dissolvido, Compostos Orgânicos Voláteis, Cor Verdadeira, DQO, Dureza, Fenóis Totais, Fluoreto Total, Herbicidas, Hidrocarbonetos Aromáticos Polinucleares, Óleos e Graxas, Praguicidas Organofosforados, Potencial de Formação de THM
Hidrobiológicos	Clorofila a e Feofitina a	Comunidades Fitoplancônicas e Zooplancônica
Ecotoxicológicos	Ensaio de Toxicidade crônica com o microcrustáceo <i>Ceriodaphnia dubia</i>	Ensaio de Toxicidade aguda com bactéria luminescente – <i>A. fisheri</i> (Sistema Microtox®), Microcistinas, Ensaio de Mutação Reversa (Teste de Ames)

Fonte: Adaptado de CETESB (2014).

A figura 4 ilustra o mapa da URGHI 6 – Alto Tietê, onde se observa também os pontos da rede básica de monitoramento da CETESB.

Figura 4. Mapa da UGRHI 6, alto Tietê contendo todos os pontos de coleta nesta região.

Fonte: SIGRH (2018)

2.2.2 Rio Tietê

O Rio Tietê, do tupi, água (*ti*) verdadeira (*eté*), é o principal corpo hídrico do Estado de São Paulo. Sua nascente se localiza no município de Salesópolis, ao leste do Estado e a 96 km da capital estadual, em uma altura de 850 m do nível do mar. A mata ciliar ainda está preservada, o que proporciona uma proteção do assoreamento e da erosão. As águas da nascente são límpidas e transparentes, com altos níveis de qualidade (FABHAT, 2015). Segundo o Departamento de Água e Energia Elétrica do Estado de São Paulo (DAEE) o rio Tietê possui em toda sua extensão 25 afluentes, sendo os principais os rios: Pinheiros, Tamanduateí, Aricanduva, Baquirivu-Guaçu, Batalha, Bauru, Baritiba-Mirim, Capivara, Capivari, Cotia, Dourado, Jacaré-Guaçu, Rio Jacaré-Pepira, Jaú, Jundiaí, Juqueri, Piracicaba, São Lourenço e Sorocaba. A figura 5 ilustra quatro imagens de diferentes pontos do rio Tietê.

Figura 5. (a) Foto da nascente do rio Tietê; (b) rio Tietê na região de Salto/SP; (c) Imagens do rio Tietê em Pereira Barreto/SP; (d) rio Tietê em São Paulo.

Fonte: SABESP(2011), CUNHA(2010) e ARQUIVO/AE(2011).

São 1.136 km percorridos pelo rio em todo Estado, no sentido interior, banhando cerca de 62 municípios que fazem parte de 5 UGRHI: Alto Tietê, Sorocaba/Médio Tietê, Tietê/Jacaré, Tietê/Batalha e Baixo Tietê. O rio deságua no rio Paraná na Cidade de Itapura, divisa com o

Estado de Mato Grosso do Sul (FABHAT, 2015). A figura 6, apresenta o mapa hidrológico do rio Tietê e seus afluentes, da nascente até a foz no rio Paraná.

Figura 6. Trajetória do rio Tietê pelo Estado de São Paulo.

Fonte: BIBLIOTECA VIRTUAL(2016).

A importância do rio Tietê não é exclusivamente ligada a aspectos econômicos. A história do rio Tietê está atrelada a do Estado de São Paulo, pois muitas cidades foram fundadas em suas margens, em épocas de colonização portuguesa, onde suas águas eram utilizadas para lazer, desenvolvimento agrícola e geração de energia. Importantes historiadores ligam a colonização do interior paulista ao rio Tietê. O rio passou por grandes mudanças ao longo destes anos, possuía quedas d'água e corredeiras em seu percurso. Todavia, com o desenvolvimento urbano, suas características foram alteradas, perdendo grande parte das suas particularidades. O represamento de suas águas, a redução da vazão das correntezas e o nivelamento das suas margens na região urbana da cidade de São Paulo foram algumas das modificações estruturais que alteraram a dinâmica hidrológica do rio Tietê (PAGANINI, 2008).

Em termos de qualidade, as alterações iniciam logo após a nascente, no município de Biritiba Mirim onde grande quantidade de resíduo da agricultura é lixiviado para o rio. No

município de Mogi das Cruzes, que utiliza água do rio para abastecimento, recebe efluentes domésticos e industriais sem qualquer tratamento (PAGANINI, 2008). Na cidade de São Paulo, o rio Tietê não possui vida aquática, principalmente por receber carga de esgoto doméstico dos seus afluentes, e mesmo com iniciativas de desassoreamento do leito do rio e a limpeza mecânica, o rio Tietê não consegue manter-se livre da poluição, isso porque a quantidade de entrada de esgoto no rio é muito maior que a depuração do mesmo. Com a carga hídrica recebida dos rios Sorocaba, Piracicaba, Capivari e Jundiaí no interior do estado têm-se uma melhora gradual da qualidade das águas. Esta melhora é relacionada a iniciativas municipais no tratamento do esgoto urbano, às características estruturais do rio que ajudam a autodepuração dos poluentes como corredeiras, quedas d'água imediatamente à jusante da Região Metropolitana de São Paulo e dos ambientes formados pelas represas de Barra Bonita, Bariri, Ibitinga, Promissão, Nova Avanhandava e Três Irmãos (PAGANINI, 2008; CAMPOS, 2012).

À 280 km da capital, no município de Barra Bonita, as águas do Tietê ficam mais límpidas. Um aspecto importante é a presença de vida no rio, peixes entre outras formas de vida. As atividades econômicas como a pesca voltam a ter relevância, e também as atividades recreativas.

2.2.3 Rio Pinheiros

O rio Pinheiros nasce do encontro dos rios Grande com o Guarapiranga e sua foz localiza-se no rio Tietê, possui um comprimento de 25 km e localiza-se na cidade de São Paulo. No Brasil colonial o rio Pinheiros foi chamado de Jurubatuba, lugar com muitas palmeiras jerivás. Passou a ser chamado de Pinheiros com a chegada dos jesuítas após a criação da aldeia de Pinheiros, nome dado pela grande quantidade de araucárias presentes no local. Foi no início do século XX que a paisagem em torno do rio começou a sofrer transformações, em função do processo imigratório, uma vez que a cidade passou a receber muitos estrangeiros e, concomitantemente, pela abundância de recursos hídricos nesta região, muitas fábricas passaram a se instalar nas proximidades. Em 1928, foram iniciadas as obras de retificação das margens do Rio Pinheiros com o objetivo de acabar com as inundações e canalizar a água para a Represa Billings, invertendo o sentido do rio, com a Usina Elevatória de Traição. A Represa Billings, desta forma, passaria a ser um grande reservatório de água para a Usina

Hidrelétrica Henry Borden, em Cubatão para gerar energia elétrica para a capital aproveitando o grande desnível da Serra do mar (LUZ, 2014).

Com o passar do tempo, as transformações na paisagem do rio Pinheiros foram aumentando: perda da mata ciliar, implantação de linhas de transmissão de energia, oleodutos, gasodutos, instalação de linhas férreas (Linha 9 da CPTM, Companhia Paulista de Trens Metropolitanos) e, principalmente, porque passou a receber esgotos domésticos e efluentes industriais. A figura 7a ilustra uma foto tirada em 1929, onde se pode ver a foz do rio Pinheiros, e a figura 7b ilustra a atual foz do rio Pinheiros, com grande modificação da paisagem, no decorrer de 86 anos RODRIGUES(2012).

Figura 7. Fotos da foz do rio Pinheiros (a) em 1929 (b) em 2015.

(a)

(b)

Fonte: RODRIGUES(2012) e DONASCI(2015).

O rio Pinheiros recebe água dos seus rios afluentes e córregos, muitos destes estão canalizados, porém alguns são receptores direto do esgoto doméstico da população instalada às margens dos córregos. (RIO... 2015)

2.2.4 Rio Tamanduateí

Sua nascente é localizada no Parque Ecológico Gruta Santa Luiza no município de Mauá e sua foz é no rio Tietê, na cidade de São Paulo. O rio Tamanduateí significa, na língua indígena tupi, rio dos tamanduás verdadeiros. Possui um comprimento de 35 km passando pelas principais cidades do Estado de São Paulo, Mauá, Santo André e São Caetano do Sul. Seus principais afluentes são Ribeirão dos Meninos, Ribeirão da Moóca, Córrego do Oratório, Córrego Guarará, Ribeirão Apiaí, Córrego Ipiranga, Ribeirão dos Couros, entre outros. A Bacia Hidrográfica do Tamanduateí tem uma área de 320 km². A figura 8 apresenta o mapa da Bacia Hidrográfica do Tamanduateí (RAMALHO, 2007).

Figura 8. Localização da Bacia Hidrográfica do Tamanduateí.

Fonte: GOUVEIA(2010).

Assim como no rio Pinheiros, a ocupação irregular dos córregos afluentes, o envio do esgoto direto para o corpo hídrico, a impermeabilização das margens, canalização e diminuição das áreas verdes são os principais problemas do rio Tamanduateí. A poluição é

oriunda do esgoto doméstico e principalmente do efluentes industriais, por ser um rio muito importante, e cruzar principais cidades da Região do ABC, cidades estas muito industrializadas. Enchentes são registradas, fruto dos mesmos problemas acima citados (RAMALHO, 2007).

2.3 Toxicologia Ambiental

2.3.1 Aspectos gerais

Uma imensa quantidade de substâncias químicas chega aos corpos hídricos, como compostos metálicos, substâncias orgânicas cloradas, não cloradas, policíclicas aromáticas, surfactantes, entre outras e, provocam modificações negativas nos estados biológicos, químicos e físicos destes rios. Os efeitos tóxicos das substâncias químicas vão depender de sua concentração. Outro ponto contemplado pela toxicologia, é a estrutura química do contaminante, as interações e o movimento entre os contaminantes da biosfera, pois são propriedades que determinam a exposição, a biodisponibilidade e a dose efetiva (DIGIULIO; NEWMAN, 2012).

Rand (1995) descreve o objetivo da toxicologia como sendo: proteger as populações e comunidades. A toxicologia ambiental é uma ciência multidisciplinar que envolve diversas áreas de estudo como biologia, química (orgânica, analítica e bioquímica), genética, fisiologia, microbiologia, ecologia, geologia, água e atmosfera, epidemiologia, estatística, legislação e a ecotoxicologia (HODGSON, 2010; YU, 2011).

Boudou e Ribeyre (1989) baseiam a análise dos processos de transferências de contaminantes nos ecossistemas e nos efeitos sobre as estruturas e funcionamento dos mesmos. Ecossistemas, por definição, são unidades funcionais da ecologia, limitados pelo tempo e espaço e que contemplam a comunidade de organismos vivos e seu hábitat abiótico (BOUDOU; RIBEYRE, 1989).

A toxicologia e toxicologia ambiental ajudam a avaliar o risco e sua extensão, definindo limites e padrões de qualidade nos principais compartimentos ambientais. Assim, é importante propor metodologias de rastreabilidade e monitoramento de contaminantes, prevendo a mobilidade, acumulação e biomagnificação, por meio de estudos toxicocinéticos. E finalmente, sugerir práticas de remediação ambiental orientando quanto a sua eficiência,

pertinência e eficácia (FERNICOLA; BOHRER-MOREL; BAINY, 2003) e auxiliar na elaboração de políticas públicas voltadas para a manutenção do meio ambiente.

2.3.2 Toxicologia ambiental e a Saúde humana

As interconexões entre a saúde humana, a integridade do meio ambiente, e a saúde ecológica são aspectos importantes a serem avaliados, principalmente devido ao número crescente de substâncias químicas e aumento da demanda e consumo. A compreensão do funcionamento do processo de degradação do ecossistema pelas substâncias químicas de origem antrópica ou não, fornece informações quanto ao impacto à saúde humana e saúde ecológica.

Di Giulio e Newman (2012) descrevem um modelo que tenta elucidar esta questão, onde enfatizam que o meio ambiente produz para a sociedade benefícios (recursos naturais e matéria-prima) e desvantagens (furacões, vetores de doenças). A sociedade, por meio das indústrias, transforma estes benefícios em bens de consumo, esforço de conservação, poluição e desmatamento. Esses desfechos alteram a qualidade de vida dos seres (humanos ou não), e o fluxo circular dos recursos naturais cria continuamente um ambiente que altera o bem-estar de indivíduos, sociedades e ecossistemas. Ou seja, as intervenções humanas nos ecossistemas aquáticos estimulam a propagação de vetores de doenças entre outros malefícios, que alteram a saúde do ser humano.

A colaboração da comunidade científica de diferentes segmentos em parceria com os responsáveis pelas diretrizes políticas, são a chave para garantir a saúde humana e ambiental. Hoje, há agências ambientais, programas de segurança química, entre outras instituições, que estão preocupadas em garantir a saúde humana e do meio ambiente, diante do risco da comercialização, uso, armazenamento, transporte, manuseio e descarte dos produtos químico, efluentes industriais e esgoto doméstico. As instituições, por sua vez, contam com um conjunto de estratégias para o controle, avaliação, prevenção e gestão dos mais diversos efeitos à saúde humana e ambiental, vindas dos riscos potenciais que representam as substâncias químicas (HACON, 2004).

A qualidade das águas superficiais é vistoriada por duas maneiras, uma complementar à outra, pelas análises químicas, que identificam e quantificam as substâncias químicas presentes, e análises biológicas, que avaliam os efeitos causados por estas substâncias. Nas análises biológicas são avaliados os seguintes aspectos: microbiológico, que avalia a presença

de microrganismos patogênicos, e a ecotoxicologia, que avalia por meio de de ensaios com organismos-teste, os efeitos agudos ou crônicos produzidos pelas substâncias químicas (KNIE; LOPES, 2004). Cada vez mais os testes ecotoxicológicos e estudos de monitoramento ambiental vêm sendo utilizados para avaliar e conhecer os efeitos que os contaminantes têm ao serem introduzidos no meio ambiente.

2.3.3 Sistema Microtox®

O teste de toxicidade aguda com a bactéria bioluminescente *Aliivibrio fischeri* (

Figura 9), sistema MICROTOX®, é utilizado mundialmente para a determinação de toxicidade em amostras ambientais e como parâmetro regulatório do lançamento de efluentes.

Figura 9. Bactéria luminescente *Aliivibrio fischeri*, organismo-teste.

Fonte:HWANG et al.(2009).

Aliivibrio fischeri é uma enterobactéria marinha, Gram negativa (POLEZA et al., 2008), que vive no intestino e em órgãos luminosos de lulas (*Euprymna scolopes*), peixes e outros animais aquáticos, estabelecendo uma relação de simbiose com seus hospedeiros (NETO, 2009).

A reação de bioluminescência é oriunda da oxidação de uma riboflavina 5-fosfato (FMNH₂) e um aldeído com cadeia carbônica longa (R-) na presença de oxigênio molecular e catalisada pela luciferina (BARRETO, 1995), como pode ser visto na equação química 1 abaixo:

As estruturas químicas das moléculas **2** e **3** envolvidas na reação **1** estão ilustradas na figura 10:

Figura 10. Mononucleotídeo de flavina ou FMN (uma flavina que funciona como grupo prostético em diversas reações de oxirredução em bioquímica). Sua forma oxidada FMN e sua forma reduzida FMNH₂.

Fonte: Autoria própria

A reação de obtenção da molécula FMNH₂ é catalisada pela FMN redutase e a espécie formada é extremamente reativa, sendo oxidada, formando peróxido de hidrogênio e FMN. Como dito anteriormente, em presença de um aldeído de cadeia longa e oxigênio, a luciferina catalisa a reação de bioluminescência, como dito anteriormente (INOUE, 1994).

A reação química descrita acima, que ocorre em condições ambientais de sobrevivência adequadas. Portanto, a luminescência reflete a atividade metabólica. Parâmetros físicos como a temperatura e químicos como o pH, a salinidade e força iônica são muito relevantes para a execução do teste e garantia da reprodutibilidade dos ensaios, sendo necessário o monitoramento destes parâmetros, e, principalmente, as alterações dos mesmos quando estes estiverem muito diferentes das condições ideais.

O ensaio consiste em quantificar a intensidade luminosa oriunda da bactéria na presença ou ausência da amostra. Assim, a intensidade luminosa varia, de forma inversamente proporcional, com a quantidade de substância tóxica presente na amostra, já que há uma interferência no metabolismo da bactéria decorrente da intoxicação. Deste modo, pode-se quantificar a toxicidade relativa da amostra com o parâmetro concentração efetiva da amostra capaz de diminuir em 50% ou 20% da intensidade luminosa (CE₅₀), ou CE₂₀, numensaio que tem 15 minutos de duração (BARRETO, 1995). É comum observar uma tendência gradual na diminuição da intensidade luminosa, pois as bactérias liofilizadas são reconstituídas em um ambiente salino, mas sem os nutrientes necessários para sua manutenção metabólica e crescimento. O aumento da luminescência também é observado em condições onde não há um controle adequado da temperatura. Deste modo, o grupo controle (I₀) deve ser corrigido por um fator de correção (F_c)(ABNT NBR 15411-1, 2012).

O fator de correção é utilizado para controlar os valores iniciais de emissão de luz I₍₀₎ de todas as cubetas e é calculado de acordo com a seguinte expressão matemática (Equação 01)(ABNT NBR 15411-1, 2012):

$$f_{(t)} = \frac{I^{\circ}_{(t)}}{I^{\circ}_{(0)}} \quad \text{Equação 01}$$

onde, $f_{(t)}$ é o fator de correção em um determinado tempo (t), $I^{\circ}_{(0)}$ é a leitura da luminescência inicial para a cubeta do branco para t=0. $I^{\circ}_{(t)}$ a luminescência final para a cubeta do branco, em um determinado tempo (t).

A correção da emissão luminosa é dada pela seguinte expressão (Equação 02):

$$I'_{(0)} = f_{(t)} \cdot I_{(0)} \quad \text{Equação 02}$$

onde, $I'_{(0)}$ é a emissão luminosa inicial para a cubeta de teste no tempo 0. $I_{(0)}$ é a luminescência inicial para a cubeta do teste no tempo 0.

Essa correção é necessária para normalizar as leituras de luminescência para todas as cubetas (ABNT NBR 15411-1, 2012).

A porcentagem de inibição luminosa (porcentagem de efeito, $\%E_{(t)}$) da amostra, ou de suas diluições, são determinadas pela seguinte expressão (Equação 03)(ABNT NBR 15411-1, 2012).

$$\%E_{(t)} = \frac{I'_{(0)} - I_{(t)}}{I'_{(0)}} \cdot 100 \quad \text{Equação 03}$$

A partir desses valores é possível construir um gráfico dose-resposta, onde no eixo das abscissas tem-se o $\%E_{(t)}$ e no eixo das ordenadas a concentração, c (ABNT NBR 15411-1, 2012). A curva típica de dose-resposta para o teste Microtox[®] é ilustrada na figura 11.

Figura 11. Imagem típico de porcentagem de efeito por concentração do Microtox, em escala logarítmica.

Fonte: Autoria própria.

A figura 11 ilustra uma tendência dos pontos a uma função logarítmica em função da concentração. A modelagem deste tipo de função é muito difícil, envolvendo muitos cálculos. Em contrapartida, é possível transformar essa tendência logarítmica em uma função linear e, desta forma, facilitar possíveis determinações de parâmetros relevantes através do fator

Gamma (Γ), que é a razão dentre o decréscimo na intensidade de luz emitida pelo organismo-teste e a intensidade remanescente em um determinado período, ou seja, em termos matemáticos (Equação 04) (ABNT NBR 15411-1, 2012):

$$\Gamma_{(t)} = \frac{\text{Luz perdida}}{\text{Luz remanescente}} = \frac{f_{(t)} \cdot I'_{(0)} - I'_{(t)}}{I'_{(t)}} \quad \text{Equação 04a}$$

$$\Gamma_{(t)} = \frac{f_{(t)} I'_{(0)}}{I'_{(t)}} - 1 \quad \text{Equação 04b}$$

A transformação em uma função linear (Equação 05a) é feita através do logaritmo da função clássica da reta, da seguinte forma (Equação 05b) (ABNT NBR 15411-1, 2012):

$$c_{(\Gamma)} = b\Gamma + a \quad \text{Equação 05a}$$

$$\log c_{(\Gamma)} = b \cdot \log \Gamma + \log a \quad \text{Equação 05b}$$

onde a é o coeficiente linear e b o coeficiente angular da reta. Após a conversão para uma função linear o gráfico típico produzido é ilustrado na figura 12.

Figura 12. Imagem do fator Gamma por concentração para determinação da CE_{50} e CE_{20} .

Fonte: Autoria própria.

Quando a perda da atividade se iguala à atividade remanescente, na Equação 04b, observa-se que $\Gamma = 1$, o que significa que houve um decréscimo de 50% na luminescência, logo este valor representa CE_{50} (ADEME, 2014). A quantidade aproximada de bactérias na cubeta assim que ela é adicionada a amostra é 10^6 células. Este valor de organismos-teste é elevado comparado a outros testes de toxicidade clássicos, o que possibilita o cálculo da CE_{20} com maior relevância estatística. Assim sendo, a CETESB, como órgão estadual responsável pelo meio ambiente, utiliza a CE_{20} como unidade de medida da toxicidade nos ensaios de toxicidade aguda envolvendo a *Aliivibrio fischeri* (Sistema MICROTOX[®]).

O analisador de toxicidade ilustrado na figura 13 é constituído por um fotômetro de precisão, câmara de incubação e reação que permanece a 15°C e uma câmara de pré-resfriamento a 3°C. O ensaio ocorre em cubetas de borossilicato, permitindo a medidas da luminescência. O ensaio é normatizado pelas Normas ISO 11348, ABNT NRB 15411, CETESB L5.227, DIN, entre outras.

Figura 13. Equipamento para realizar os testes de toxicidade.

Fonte: MODERN(2015).

As vantagens do ensaio são: baixo custo, rapidez na sua realização (15 minutos a 30 minutos), pequena quantidade de amostra, fácil execução e a sensibilidade do organismo a várias substâncias químicas. A bactéria *Aliivibrio fischeri*, dentre os organismos-testes disponíveis para ensaio de toxicidade agudo, destaca-se pela resistência a baixa quantidade de oxigênio presente na amostra. Possibilitando que amostras de rios altamente poluídos, impactados, como os rios Tietê, Pinheiros e Tamanduateí possam ter sua toxicidade aguda determinada. A variabilidade genética e a necessidade do condicionamento da bactéria liofilizada são as principais desvantagens do método, além da falta de sensibilidade em

presença de amônia, encontrada frequentemente em amostras de sedimento (GOODFELLOW et al., 2005).

2.4 Avaliação e identificação da toxicidade

A abordagem da Avaliação e Identificação da Toxicidade (*Toxicity Identification Evaluation*, TIE) é baseada na remoção sequencial de várias frações químicas juntamente com o teste de toxicidade das frações obtidas (GUZZELLA et al., 1996). TIE foi desenvolvido pela *United States Environmental Protection Agency* – USEPA no início de 1980, com a publicação de uma série de manuais que posteriormente foram reunidos e reeditado com o título de “A avaliação e identificação da toxicidade de águas residuais”(USEPA, 1991). O TIE foi dividido em três fases. A primeira fase do TIE envolve a caracterização da toxicidade da amostra. Esta caracterização acumula informações para direcionar a identificação dos agentes tóxicos realizada na fase 2. Para remover ou alterar a toxicidade da amostra são realizadas manipulações simples, assim como para se determinar as características físicas ou químicas dos agentes tóxicos presentes na amostra, são realizados testes de toxicidade aguda. Alguns resultados obtidos na fase 1 são indicativos de agentes tóxicos específicos, porém esta fase apenas fornece evidências das características de grupos de substâncias químicas que podem causar efeitos tóxicos. Estas informações devem ser usadas na fase 2 para a identificação dos agentes tóxicos. A fase 3 é descrita como confirmação, ou seja, confirmar se a hipótese levantada está correta.

2.4.1 Fase 1: Fase da Caracterização

Como já dito anteriormente, a fase 1 baseia-se na caracterização do agente tóxico em função das suas propriedades físico-químicas. Segundo o método da USEPA (1991), os testes realizados na fase 1 têm por finalidade tornar não disponível um grupo de agentes tóxicos (oxidantes, metais catiônicos, compostos voláteis, compostos orgânicos apolares e metais queláveis). Testes de toxicidade realizados antes e depois das manipulações indicam quais grupos de constituintes foram alterados (USEPA, 1991). Cada uma das manipulações descritas é realizada com o objetivo de alterar a toxicidade de um grupo de constituintes específicos. A figura 14 ilustra um fluxograma que exemplifica as manipulações que envolvem a fase 1.

```

graph TD
    TI[Teste de Toxicidade Inicial] --> A[Amostra]
    A --> TRTS[Teste Redox Tiosulfato de sódio]
    TRTS --> TT1[Teste de toxicidade]
    A --> EDTA[EDTA]
    EDTA --> TT2[Teste de toxicidade]
    A --> GP6[Gradação pH 6]
    GP6 --> TT3[Teste de toxicidade]
    GP6 --> AJP3[Ajuste ácido pH 3]
    AJP3 --> TT4[Teste de toxicidade]
    AJP3 --> P3F[pH 3 e filtração]
    P3F --> TT4
    P3F --> P3FE[pH 3, filtração e extração em fase sólida (HLB)]
    P3FE --> TT4
    A --> GP8[Gradação pH 8]
    GP8 --> TT5[Teste de toxicidade]
    GP8 --> AJP11[Ajuste básico pH 11]
    AJP11 --> P11F[pH 11 e filtração]
    P11F --> TT6[Teste de toxicidade]
    P11F --> P11FE[pH 11 filtração e extração em fase sólida (HLB)]
    P11FE --> TT6
    A --> PI[pH inicial]
    PI --> TT7[Teste de toxicidade]
    PI --> PIF[pH i e filtração]
    PIF --> TT7
    PIF --> PIFE[pH i, filtração e extração em fase sólida (C18)]
    PIFE --> TT7
  
```

As condições de aerobiose e anaerobiose são essenciais para as espécies metálicas na definição de suas características em termos de especiação, e como este metal se encontra no meio ambiente. O teste de quelação por ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) corresponde à adição do mesmo na amostra para que metais dissolvidos e tóxicos sejam convertidos a sua forma complexo-metálico (BURATINI, 2011). O teste dos agentes oxidantes com tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$), agente redutor, reage com substâncias como cloro, iodo, bromo entre

outras, podendo complexar com metais catiônicos como cobre, manganês, prata e selênio (USEPA, 1991). Quando as substâncias oxidantes causam efeito tóxico, este efeito é alterado após a adição do tiosulfato de sódio, onde se espera observar uma redução na toxicidade.

O teste com aeração tem por finalidade identificar se a toxicidade é oriunda de compostos voláteis ou por tensoativos pelo processo de flotação. O teste é simples, injeta-se na amostra em fluxo constante ar filtrado. Neste procedimento o oxigênio presente no ar atmosférico pode oxidar compostos metálicos presentes na amostra, bem como favorecer a volatilização de compostos orgânicos com baixo ponto de ebulição e formar com os tensoativos sistemas coloidais de interface ar-líquido.

O teste de extração por fase sólida, SPE (*solid phase extraction*) é utilizado para determinar a toxicidade de amostras com compostos orgânicos apolares ou complexos metálicos, relativamente apolares. O método da USEPA indica o uso de cartuchos C18, mas sugere que também podem ser utilizadas outros cartuchos existentes no mercado. Atualmente, existem diversos tipos de fase para cartuchos: trocadores de ânions (SAX) (MAXXAM, 2010), trocadores de cátions (SCX), ideais para compostos polares (LC-NH₂), antibióticos, fármacos, surfactantes e nucleotídeos (WCX) entre outros (SIGMA-ALDRICH, 1998). Este método em especial receberá maior atenção para melhor compreensão de seus fundamentos.

O guia da USEPA (1991) contém uma tabela com alguns exemplos de interpretação para os dados obtidos na fase 1 do TIE, tabela 2:

Tabela 2. Exemplos de possível interpretação para os testes da Fase 1

Classe a que pode pertencer o agente tóxico	Resultado da Fase 1
Compostos apolares	✓ Remoção total da toxicidade da amostra pela extração em fase sólida, geralmente acompanhada da recuperação da toxicidade pela eluição com metanol.
Sólidos totais dissolvidos	<ul style="list-style-type: none"> ✓ A toxicidade não se altera com nenhum dos ajustes de pH, exceto quando há formação de um precipitado com ajuste de pH, ajuste de pH e filtração ou ajuste de pH e aeração. ✓ Não há redução de toxicidade pela extração em fase sólida, ou apenas parcial sem alteração na condutividade. ✓ Não há alteração na toxicidade com as adições de EDTA e tiosulfato ou no teste de gradação do pH.
Surfactantes	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Remoção ou redução da Toxicidade: ✓ Por filtração ✓ Por aeração (em alguns casos, a toxicidade pode ser recuperada a partir das paredes do recipiente utilizado na aeração). ✓ Pela extração em fase sólida (coluna C₁₈) ✓ A toxicidade diminui ao longo do tempo quando a amostra é mantida sob refrigeração e a degradação é mais lenta se a

Continua na página seguinte

	amostra é armazenada em frasco de vidro, em vez de frasco de plástico.
Metais catiônicos	<ul style="list-style-type: none">✓ A toxicidade é removida ou reduzida:✓ Pela adição de EDTA ou tiosulfato de sódio✓ Pela extração em fase sólida✓ Por filtração, especialmente quando combinada com ajuste de pH.
Oxidantes	<ul style="list-style-type: none">✓ Redução da toxicidade com a adição de tiosulfato de sódio✓ Pela aeração sem ajuste de pH✓ Quando a amostra se torna menos tóxica ao longo do tempo, independentemente do frasco de armazenagem.

Fonte: Adaptado de BURATINI(2005) e USEPA(1991).

2.4.2 Fase 2: Fase de Identificação

Com as informações obtidas na fase 1, pode-se iniciar a fase 2 de modo a identificar os agentes tóxicos presentes. Nesta etapa a instrumentação analítica, como técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, *high performance chromatography*) e gasosa (GC, *gas chromatography*), são fundamentais para a identificação de compostos orgânicos extraídos e devidamente fracionados.

Para determinação de metais são muito empregadas técnicas multielementares como espectrometria de emissão óptica por plasma acoplado indutivamente (ICP-OES, *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*) e espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS, *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*). Também, podem ser usadas técnicas como a espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS, *Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry*), espectrometria de absorção atômica de chama (FAAS, *Flame Atomic Absorption Spectrometry*)(LEUSCH et al., 2012), mas sempre lembrando que o direcionamento analítico deve ser feito com base nos resultados obtidos da fase 1.

Vale ressaltar que algumas dificuldades podem ser encontradas nesta etapa, principalmente para compostos orgânicos polares como polímeros, surfactantes, produtos de degradação, entre outros, exigindo uma abordagem mais sofisticada e procedimentos não validados (MELO, 2012). Identificações da classe dos compostos (fase 1) são frequentemente alcançadas, porém a confirmação do composto tóxico, Fase 2 propriamente dita, se torna mais difícil. As informações coletadas na fase 1 já podem ser suficientes para se tomar decisões a respeito do tratamento ou política de gestão ambiental apropriada (HEWITT; MARVIN, 2005).

2.4.3 Fase 3: Fase da Confirmação

Na fase 3, a amostra devidamente caracterizada e identificada deve passar pela confirmação, que consiste em testes químicos e toxicológicos adicionais a fim de validar a hipótese. São descritos quatro métodos no documento da USEPA: análise de correlação, observação de sintomas, sensibilidade comparada de espécies e adição de contaminantes (*spiking*).

A análise de correlação envolve testes de toxicidade de diferentes amostras com a concentração medida do composto tóxico suspeito. Uma correlação significativa é evidenciada quando o composto identificado for realmente o agente tóxico da amostra (MELO, 2012). Os problemas decorrentes desta análise estão na presença de mais de um agente tóxico, além do efeito matriz, desta forma, deve-se usar uma segunda abordagem que permita a confirmação do analito suspeito (BURATINI, 2011).

O método de observação de sintomas consiste em testar a toxicidade das substâncias químicas suspeitas e avaliar os sintomas após um determinado tempo de exposição e comparar com os sinais gerados quando se utiliza as amostras em estudo. A confirmação se dá quando os sinais observados são semelhantes. Este método não pode ser aplicado ao sistema Microtox[®], uma vez que as bactérias não vão desenvolver indicadores clássicos de exposição.

A sensibilidade das espécies é um método baseado nas reações diferenciadas que o mesmo agente tóxico pode produzir em outras espécies. Testes com a amostra são realizados em duas espécies, e a hipótese será considerada verdadeira se o teste com a substância pura produzir o mesmo efeito que as espécies apresentaram quando se aplicou a amostra.

Por último, o método de adição de contaminante (*spiking*) refere-se justamente à adição do composto suspeito na amostra e em concentrações crescentes para determinar se a toxicidade aumenta de forma proporcional à quantidade do composto adicionado. Se a causa da toxicidade for uma mistura de agentes tóxicos, deve-se considerar os efeitos de adição e sinergismos e as quantidades adicionadas devem ser bem estabelecidas e previamente estudadas (USEPA, 1993).

Os guias da USEPA que descrevem as fases do TIE, não precisam ser seguidos nesta ordem e até recomenda-se que alterações sejam feitas para atender as necessidades técnicas e econômicas de cada situação. Vale lembrar que estes guias foram elaborados em 1991 e ao longo de 24 anos, muitos procedimentos mudaram ou foram atualizados, além de avanços

tecnológicos nas análises químicas e toxicológicas, assim incorporar essas mudanças também é parte integrante do processo.

2.5 Fracionamento Químico

Fracionamento é processo, segundo Templeton (2000), de classificação de um analito ou um grupo de analitos de uma certa amostra de acordo com suas propriedades físicas (tamanho, solubilidade) e químicas (ligação, reatividade). As frações podem se basear em muitas propriedades químicas, tais como afinidade, carga e hidrofiliicidade, ou serem obtidas por separação física (por exemplo, filtração, centrifugação, cromatografia de exclusão de tamanho). Há diversos protocolos hoje na literatura científica para situações específicas de fracionamento para diversas matrizes. A fração não é somente definida pelo solvente utilizado, mas sim por todos os fatores possíveis.

Embora a determinação direta da molécula não seja possível em muitas situações, devido à complexidade da matriz, ou dificuldades instrumentais, os métodos disponíveis ainda podem fornecer muita informação. Uma avaliação do impacto ambiental de uma substância pode ser feita sem determinar o poluente responsável (TEMPLETON et al., 2000).

Na prática o fracionamento químico apresenta limitações quanto a sua seletividade. A limitação da seletividade é determinada pela escolha dos reagentes e protocolos empregados no fracionamento comprometendo a repetibilidade, a reprodutibilidade e até mesmo dificultando a interpretação dos resultados (SILVA, 2014). A aplicação do fracionamento é relevante quando na sua execução são monitorados todos os fatores experimentais (PÉREZ-CID; LAVILLA; BENDICHO, 1996). Desta forma, o fracionamento não é definido pelos solventes utilizados, tão pouco pelo reagente e sua concentração, mas sim pelos fatores possíveis de serem relatados no ensaio. Alguns fatores como o tempo de extração e o tempo de agitação são relacionados à cinética das transformações químicas envolvendo o extrator, os componentes da amostra e reagentes empregados. A variação da temperatura, que normalmente é executada numa faixa de 20-25°C, pode causar, dependendo de sua magnitude, pequenas variações de resultado (PÉREZ-CID; LAVILLA; BENDICHO, 1996; HLAVAY; POLYÁK, 2005).

O número de etapas no fracionamento químico é determinante. Há casos de procedimentos envolvendo oito ou mais etapas, levando dias para serem executadas devido a sua complexidade. Um procedimento com número menor de etapas e uso de poucos reagentes

são estratégias mais viáveis e fornecem informações relevantes com maior precisão e exatidão quando comparadas com um fracionamento de muitas etapas (POTTS; ROBINSON, 2003).

As limitações relativas ao fracionamento químico aqui descritas não descredibiliza os valores de sua aplicação, porém é importante levarem consideração as suas limitações afim de contorná-las, como por exemplo: o protocolo de extração sequencial deve focar em uma substância ou em um grupo de substâncias bem definidos. Deve-se seguir o procedimento minuciosamente, controlando todas as variáveis experimentais e um método padronizado (POTTS; ROBINSON, 2003).

2.5.1 Extração em fase sólida

A extração em fase sólida é uma técnica de separação na qual é utilizada uma coluna aberta, denominada cartucho de extração, que contém a fase estacionária, ou fase sólida. A amostra contendo o analito de interesse é colocada na parte superior do cartucho de extração e levemente aspirada por vácuo e, também, pode ser pressionada por um êmbolo ou um gás inerte ou por gravidade. O analito, por sua vez, fica retido no cartucho e é eluído com um pequeno volume de solvente determinado.

A extração em fase sólida envolve algumas etapas que são: (1) condicionamento do cartucho, sendo esta etapa de ativação da fase sólida. Essa etapa envolve a passagem de um solvente apropriado que dependerá do material constituinte da fase sólida, ou do próprio método empregado. O solvente usado deve penetrar toda a fase sólida de forma que ela permaneça úmida. A secagem da fase sólida pode criar caminhos preferenciais dificultando a separação e comprometendo a reprodutibilidade. (2) Adição da amostra, o transporte da amostra para o interior do cartucho pode ser realizado com auxílio de micropipetas automáticas, ou de vidro, seringas para escalas de microlitros a pequenos mililitros de amostras. Para volumes maiores de amostra é comum o uso de mangueiras do tipo cânulas onde, com adaptadores especiais que prendem na extremidade superior do cartucho, cria-se um sistema pressurizado capaz de conduzir a amostra para o interior do cartucho. A velocidade de aplicação da amostra é crítica nesta etapa, sendo feita majoritariamente de forma lenta com fluxo igual ou inferior a 5 mL min^{-1} . O controle do fluxo é realizado por ajustes na pressão do vácuo. (3) A remoção dos interferentes ou lavagem com solvente, com força suficiente para não eluir o analito de interesse, contudo capaz de eluir os interferentes na amostra. (4) Eluição do analito, emprega-se para este fim o uso de um solvente que possua

afinidade pelo analito de interesse. Assim, o analito será eluído da fase estacionária no menor volume possível para que a concentração final seja apropriada para se realizar a análise. Para melhorar a eficiência da extração deve-se utilizar duas alíquotas de solvente extrator em vez de um único volume maior e um tempo de permanência de cada alíquota no cartucho de, aproximadamente, 1 min e 30 s (ANDRADE-EIROA et al., 2016).

A figura 15 resume as etapas que envolvem a extração em fase sólida, descrita anteriormente.

Figura 15. Ilustração das etapas que compõem a extração em fase sólida, que compreendem: condicionamento, adição da amostra, lavagem para remoção de interferentes e eluição dos analitos de interesse.

Fonte: ANDRADE-EIROA et al. (2016).

Há no mercado uma enorme disponibilidade de fases estacionárias com diferentes polaridades. Essa quantidade é fruto do recobrimento da base de sílica, ou alumina, com grupos polares ou apolares. Atualmente, o tipo mais comum de fase estacionária é C_{18} ligada à sílica. Outra fase estacionária comum são as de base polimérica que apresentam polímeros com substituinte polares, ou com grupos iônicos que dão um caráter polar à fase estacionária, como por exemplo, cartuchos mistos de troca catiônica de fase reversa (MCX), cartuchos de equilíbrio hidrofílico-lipofílico de fase reversa (HLB) e cartuchos mistos de troca aniônica de fase reversa (MAX) (HARRIS, 2013; WATERS CORPORATION, 2014). A figura 16 ilustra a estrutura química de cada material e seus sítios de interação hidrofílico, lipofílico, aniônico e catiônico.

Figura 16. Estruturas químicas da resina de preenchimento do cartucho de SPE. MCX (cartuchos misto de troca iônica de fase reversa) HLB (cartuchos de equilíbrio hidrofílico-lipofílico de fase reversa) e MAX (cartuchos mistos de troca aniônica de fase reversa)

Fonte: Autoria própria.

Os cartuchos do tipo C_{18} estão entre os mais utilizados pela comunidade científica e pelos laboratórios particulares. Basicamente, trata-se de um tipo de coluna versátil para extração de compostos apolares, isso porque, as estruturas de octadecil (18 carbonos) ligadas à superfície da sílica dão um caráter apolar ao conjunto (vide figura 17). Assim que o analito apolar passar por essa cadeia hidrofóbica, forças intermoleculares agirão sobre o analito e o retém. A eluição ocorrerá quando um solvente com uma afinidade maior pelo analito passar pela estrutura de sílica-octadecil, carregando-o (HARRIS, 2013; WATERS CORPORATION, 2014).

Figura 17. Região de interface de uma partícula de sílica funcionalizada com uma cadeia de octadecil (18 carbonos), uma estrutura extremamente apolar.

Fonte: Autoria própria.

Os cartuchos do tipo HLB utilizam uma proposta diferente das C_{18} , uma vez que a estrutura “suporte” é um polímero. Estruturas como anéis aromáticos e amida fornecem sítios de interação do tipo π - π e dipolo-dipolo, respectivamente. Todo o restante da cadeia polimérica é um sítio para as interações apolares o que dá um caráter hidrofílico-lipofílico à estrutura como um todo. Os cartuchos HLB acabam tendo uma retenção maior de substâncias tanto apolares quanto polares. Uma grande variedade de solventes e suas misturas podem ser usadas para se obter frações específicas com grupo de substâncias de interesse. Há possibilidade de adições de grupos iônicos (MCX e MAX) ao polímero “suporte” como grupos sulfidrilas, e aminas quartenárias e com essa adição, cátions e ânions, respectivamente, passam a sofrer interações eletrostáticas nesta região do polímero e ficam retidas até que um solvente com maior afinidade, um tampão, por exemplo, seja usado para eluí-las (HARRIS, 2013; WATERS CORPORATION, 2014).

2.5.2 Filtração, mudança no pH e outras manipulações

A filtração é um processo de separação física onde uma amostra passa por uma membrana com uma porosidade específica a fim de separar a parte sólida da amostra líquida, solúvel. O sólido que ficou retido no filtro pode ser decomposto, ou lixiviado e analisado em seguida. Há possibilidade de utilizar um pré-filtro de fibra de vidro para amostras com um teor de sólido em suspensão (KRUG, 2008). Muitas substâncias químicas orgânicas e inorgânicas, como

tensoativos, chumbo, cobre, entre outros, podem ligar-se reversivelmente às partículas suspensas presentes na água.

Reagentes comumente utilizados no fracionamento químico são os ácidos e os complexantes. Os agentes complexantes são capazes de ligar-se à maioria dos metais ligados a carbonatos e matéria orgânica, além dos cátions livres em solução sendo mais empregado uma solução de EDTA. Os ácidos clorídrico ou acético simulam em certa proporção a diminuição do pH causada por diferentes fatores como por exemplo o derramamento de ácido, ou até mesmo a chuva ácida (SAHUQUILLO; RIGOL; RAURET, 2003).

A adição de qualquer espécie, ácida ou básica, no sistema provoca uma alteração profunda nas proporções dos ácidos e bases no meio. A influência do pH no meio também pode provocar alterações na solubilidade das espécies (HARRIS, 2013). Em resumo, a alteração do pH pode causar a saída de prótons (H^+) das moléculas, tornando bases conjugadas, ou a protonação de sítios básicos, levando aos ácidos conjugados. Por sua vez, estas espécies podem alterar a solubilidade, permitindo sua precipitação ou solubilização. Há uma mudança na dinâmica redox quando se altera o pH da amostra. Também, o potencial redox é alterado pela concentração de íons hidrônio e consequentemente o estado de oxidação de algumas espécies pode alterar. Essa mudança pode gerar transformações químicas no meio que também podem ser alcançadas usando reagentes redutores ou oxidantes na amostra, uma vez que estes reagentes alteram o estado de oxidação através de reações químicas denominadas reações de oxirredução. Um típico reagente com estas características é o tiosulfato de sódio ($Na_2S_2O_3$) que reduz os halogênios na amostra.

3 OBJETIVOS

3.1 Gerais

Adaptar a metodologia de Avaliação e Identificação de Toxicidade, referente a fase 1 do protocolo (*Toxicity Identification Evaluation*) para o Sistema MICROTOX[®], uma vez que o TIE foi desenvolvido para testes ecotoxicológicos mais complexos, nas amostras dos rios Tietê, Pinheiros e Tamanduateí, visando estabelecer os compostos responsáveis, ou a classe à qual pertencem, pela eventual toxicidade destes rios.

3.2 Específicos

- Investigar novas metodologias na aplicação do TIE, testando diferentes fases sólidas e fracionando as amostras oriundas dos rios Tietê, Pinheiros e Tamanduateí que fazem parte da rede de monitoramento da CETESB;
- Identificar o agente tóxico ou a classe à qual pertence, através do desenvolvimento do TIE;
- Elaborar um protocolo para investigação da toxicidade aguda dos agentes eventualmente indicados nos ensaios anteriores

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostragem e Coleta

As localizações dos três pontos de coleta estão resumidas com as posições geográficas (latitude e longitude) na tabela 3:

Tabela 3. Localização geográfica dos pontos de coleta para os três rios, Tietê, Pinheiros e Tamanduateí utilizados neste trabalho.

Ponto CETESB	Corpo Hídrico	Local da amostragem	Latitude S	Longitude W
TIET 4180	Rio Tietê	Ponte das Bandeiras, na Av. Santos Dummont	23° 31' 18"	46° 37' 52"
PINH 4900	Rio Pinheiros	Próximo à sua foz no rio Tietê, na estrutura de retiro	23° 31' 52"	46° 44' 54"
TAMT 4900	Rio Tamanduateí	Ponto na Av. Santos Dumont, em frente à Secretaria dos Transportes, em São Paulo	23° 31' 36"	46° 37' 56"

Fonte: CETESB(2014)

Com auxílio de um balde de aço inox polido AISI 316L coletou-se 2 L de amostra preenchendo todo o volume do frasco evitando a presença de ar. A amostra foi identificada e acondicionada em caixas térmicas, sob refrigeração até o laboratório.

A coleta das amostras dos rios Pinheiros, Tietê e Tamanduateí foram realizadas pelo Setor de Amostragem da CETESB, seguindo o procedimento descrito pelo Guia Nacional de Coletas e Preservação de amostra (2011). A coleta da amostra seguiu um cronograma estabelecido anteriormente pelos gerentes dos setores (Tabela 4). As amostras coletadas inicialmente (março e maio) foram usadas para os primeiros testes realizados de complexação e oxirredução. Já nos meses seguintes, focou-se nos procedimentos de extração em fase sólida.

Tabela 4.Cronograma de coleta realizado.

Rios		Março	Maio	Julho	Setembro	Novembro
Tietê	Dias	09	10	20	29	24
Pinheiros		30	19	13	14	29
Tamanduateí		03	18	28	21	09
Procedimento		EDTA e Na ₂ S ₂ O ₃		Extração em fase sólida		

Fonte: Autoria própria

As amostras foram encaminhadas para o Setor de Análise Toxicológica, posteriormente, os dois litros coletados foram divididos em 8 frascos de plástico descartável, de polímero inerte, de 250 mL cada, onde foram devidamente etiquetados com o número da amostra, nome do rio e data da coleta. As 8 alíquotas foram congeladas em freezers, -15°C a -25°C . Quando necessário o uso das amostras elas foram descongeladas no dia anterior ao da manipulação. Também foi coletada uma água natural que não apresentasse toxicidade ao sistema Microtox[®] para utilizar como branco analítico. Coletou-se a água do rio Jaguarí e esta foi utilizada em todo o ensaio, após comprovada a sua inocuidade.

4.2 Materiais

4.2.1 Reagentes

Solução de sulfato de zinco $6,16\text{ mg L}^{-1}$ foi preparada a partir do sal de sulfato de zinco heptaidratado $\geq 99,0\%$ ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) da Sigma-Aldrich (EUA), bem como as outras soluções: solução de dicromato de potássio $75,8\text{ mg L}^{-1}$ preparada a partir do sal de dicromato de potássio $\geq 99,5\%$ ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) da Sigma-Aldrich (EUA). Solução aquosa de fenol ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}$) $47,52\text{ mg L}^{-1}$ foi preparada usando padrão NIST de fenol em água $1000\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$, solução de EDTA 15 g L^{-1} preparada através do sal disódio do ácido etilenodiaminotetracético diidratado Titriplex[®] III GR da Merck (Holanda), também se preparou a solução de tiosulfato de sódio $1,62\text{ g L}^{-1}$ a partir do sal pentahidratado da Êxodo Científica (Brasil). A solução de ajuste osmótico (SAO) de cloreto de sódio 22% (m v^{-1}) P.A. da Dinâmica Química Contemporânea LTDA (Brasil), bem como a solução diluente contendo NaCl 2% (m v^{-1}) em água. Para alterar o pH da amostra durante o fracionamento usou-se soluções de ácido clorídrico 1 mol L^{-1} e hidróxido de sódio 1 mol L^{-1} usando ácido clorídrico (HCl) 37% (v v^{-1}) da Carlo Erba e hidróxido de sódio (NaOH) micropérolas P.A. da Sigma-Aldrich (Brasil). Solventes de grau analítico ou maior foram empregados neste trabalho para eluição: metanol (CH_3OH) da Merck, diclorometano (CH_2Cl_2) $99,9\%$ UV/HPLC – Espectroscópico da Sigma-Aldrich, acetato de etila ($\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3$) da J.T. Baker, ácido fórmico (HCOOH) $98-100\%$ (v v^{-1}) da Scharlau (Espanha) e n-hexano (C_6H_{14}) da J.T. Baker (EUA). A água utilizada no preparo das soluções e nas demais possíveis finalidades foi obtida por um sistema de osmose reversa da Elga um PureLAB Ultra SC. Soluções fortificadas com chumbo e prata 10 mg L^{-1} a partir de soluções NIST de nitrato de prata e nitrato de chumbo.

4.2.2 Equipamentos

Para determinar a toxicidade da amostra e das frações obtidas utilizou-se um analisador de toxicidade Sistema Microtox® modelo 500 analyzer da ModerWater (fabricada no EUA em 2012). A bactéria liofilizada e a solução de reconstituição foram comercialmente adquiridas pela ModerWater. O ensaio foi realizado em cubetas 12x50 mm de borrossilicato não tóxicas, à temperatura ambiente 20 ± 5 °C. O pH foi medido por um medidor de pH WTW modelo 1970i (Alemanha) com eletrodo de Ag₀/AgCl preenchido com cloreto de potássio (KCl) 1 mol L⁻¹ da WTW modelo pH-Elektrode Sentix81. Balanças Mettler Toledo modelo XS400SDR DeltaRanger® (2010) e Mettler AE 166 foram utilizadas para pesar reagentes.

Alguns equipamentos ou sistemas, como a filtragem a vácuo utilizando filtro da Merck HA em ésteres de celulose (nitrato 75-80% e acetato), 0,45 µm, diâmetro de 47 mm, branca, lisa e vidrarias de laboratório como Kitassato, funil de vidro, rolha de borracha para vedação e garra, quando a amostra apresentava muito material em suspensão usou-se um pré-filtro de fibra de vidro GF/3F 1,2 µm com diâmetro de 47 mm da Axiva, logo acima do filtro.

As frações eluídas em solvente não apropriado para o Sistema Microtox® tiveram seu solvente evaporado em concentrador de amostra Genevac EZ-2.3 da SP Scientific, conforme ilustra a figura 18:

Figura 18. Concentrador de amostras utilizado na evaporação de solventes.

Fonte: Autoria própria

Neste trabalho foram utilizados tubos de centrífuga de 50 mL tipo Falcon, juntamente com um agitador Multi Reax da Heidolph (Alemanha). O sistema de extração em fase sólida usado consiste em uma linha de vácuo central, mangueiras, *manifold* Varian VAC ELUT 20W/TALL Glass 16x150 mm, ou Supelco visiprep 24TM DL e os cartuchos SPE: Oasis[®] HLB 6cc (500 mg) LP Extraction Cartridge (Irlanda) da Waters, Bond Elut-PPL, 200 mg 3 mL, 50/PK (EUA) da Agilent e Bond Elut-C18, 500 mg 6 mL, 30/PK (EUA) também da Agilent. A montagem do sistema de extração em fase sólida utilizada é ilustrada na figura 19 onde pode-se ver a disposição de cada item descrito

Figura 19. Sistema montado para extração em fase sólida (SPE).

Fonte: Autoria própria

Outro sistema utilizado foi o de aeração que consiste em uma linha de ar comprimido, mangueiras, um agitador magnético multiposição, um difusor de ar, filtro de seringa descartável Chromafil[®] O-45/25 0,45 μ m e 25 mm de diâmetro. Os divisores de ar foram colocados em série e ligados a uma mangueira conectada na outra extremidade ao filtro 0,45 μ m que por sua vez conectou-se com a linha de ar comprimido central. Em cada saída do

divisor conectou-se mangueiras e na outra extremidade para que não entrasse em contato com a amostra encaixou-se ponteiros de plástico de 100 µL para micropipetadores automáticos. O resultado final e a imagem do sistema estão apresentados na figura 20:

Figura 20. Sistema montado para aeração da amostra, que consiste na ligação de 7 divisores de ar, ligados entre si. Uma mangueira adaptada com um filtro é ligada diretamente à linha de ar comprimido e em cada saída do divisor é conectada uma mangueira que por sua vez é colocada na amostra.

Fonte: Autoria própria

Em cada um dos quatro béqueres contendo a amostra adicionou-se uma barra magnética e passando por agitação por meio de um agitador magnético multiposição. As mangueiras foram imersas nos béqueres e o sistema de ar comprimido foi ligado, e a solução foi agitada por 1 hora.

Este trabalho foi realizado em parceria com a Companhia Ambiental do Estado de São Paulo – CETESB que cedeu toda sua infraestrutura para o desenvolvimento do projeto e o financiou. Desta forma, foram seguidas todas as normas internas da qualidade que um laboratório acreditado pela NBR/ISO 17025 possui, bem como todos os critérios de aceitação estabelecidos pela companhia para validar os resultados. Soares (2017)¹ ressalta que o ensaio de toxicidade aguda, sistema Microtox[®], é um ensaio muito bem estabelecido na companhia

¹ Informação fornecida por Wálace Anderson Almeida Soares durante reuniões na CETESB, São Paulo, 2017.

sendo utilizado desde 1988 no monitoramento das águas paulistas (informação verbal). Hoje, o ensaio faz parte do escopo do Setor de Análises Toxicológicas – ELTA da companhia.

4.2.3 Softwares

Os softwares utilizados no tratamento estatístico foram o IBM® SPSS® Statistics Versão 22 e para confecção dos gráficos os softwares STATISTICA 10 (StatSoft, Inc) e Microsoft® Excel® 2013. O processamento dos dados de luminescência e os cálculos para obtenção da CE20 bem como outros parâmetros relevantes foram gerenciados pelo MicrotoxOmni™ versão 1.12.

4.3 Procedimentos Experimentais

4.3.1 Protocolo de execução do ensaio de toxicidade aguda sistema Microtox®

4.3.1.1 Reconstituição da bactéria liofilizada

Uma cubeta vazia foi inserida no poço de reagente e em seguida transferiu-se 1,0 mL de solução de reconstituição. Retirou-se a ampola contendo as bactérias liofilizadas, também chamada de reagente Microtox®. Segurando a ampola na parte superior, removeu-se o lacre de alumínio e a rolha de borracha com auxílio de uma pinça metálica. Em seguida, verteu-se a solução de reconstituição contida na cubeta para a ampola, homogeneizando levemente a suspensão por alguns segundos. Pipetou a suspensão para a cubeta que continha a solução de reconstituição com um micropipetador, novamente homogeneizou-se a suspensão e retornou-se a cubeta para posição inicial no poço de reagente no aparelho.

4.3.1.2 Ensaio de toxicidade aguda com substância de referência

Após a reconstituição da bactéria liofilizada fez-se necessário verificar as condições da bactéria referente a resposta toxicológica, sua propriedade luminescente. A verificação é realizada calculando a porcentagem de efeito tóxico de três substâncias de referência Zn^{2+} , C_5H_6O e Cr^{6+} e plotando os valores obtidos em cartas controles. O valor deve estar entre os limites superiores e inferiores da carta, deste modo, dá-se prosseguimento aos testes.

O ensaio foi realizado adicionando 1 mL de cada solução de referência em três cubetas distintas mais o controle com 1 mL de diluente e 10 µL da suspensão (bactéria mais solução de reconstituição) em 500 µL de SAO. Após 15 minutos, transferiu-se 500 µL das soluções de referência para a cubeta contendo a bactéria, o ensaio é finalizado após decorridos 30 minutos (tempo de exposição) com a leitura da luminescência. A luminescência é medida inicialmente (I_0) e após os 30 minutos (I_{30}) para as quatro cubetas separadamente. O software MicrotoxOmni™ calcula a porcentagem de efeitos utilizando as equações 1 e 3, descritas anteriormente. O resultado obtido é plotado na sua respectiva carta controle.

4.3.1.3 Ensaio de toxicidade aguda seriada da amostra

O intuito deste ensaio é obter a CE_{20} da amostra por meio de curva dose-resposta. As diluições foram realizadas em 9 cubetas distintas, seguindo-se a proporção de 1:2. Na primeira cubeta adicionou-se 200 µL de SAO (NaCl 22%, $m\ v^{-1}$) e 2 mL de amostra com posterior homogeneização. Nas oito cubetas restantes adicionou-se 1 mL de solução diluente. Transferiu-se 1 mL da primeira para segunda cubeta, e assim sucessivamente, sempre com homogeneização prévia. Uma cubeta com 1 mL de diluente foi adicionada como controle do ensaio. Em alguns casos houve necessidade de realizar uma diluição 3:2 para melhor delineamento da curva dose-resposta, alterando-se, então, os volumes de amostra, SAO e solução diluente de forma a obter a proporção necessária.

A suspensão bacteriana foi diluída 10x em diluente antes de entrar em contato com a amostra. O tempo de exposição total foi de 15 minutos, sendo feito um registro em 5 minutos. O ensaio inicia-se quando 0,9 mL da amostra diluída de cada cubeta, mais o controle, entram em contato com 100 µL da bactéria diluída 10x. O software gerencia os dados e calcula o valor de CE_{20} usando as equações 1, 2, 3, 4b e 5b citadas anteriormente.

4.3.1.4 Ensaio de toxicidade aguda em dose única

Este teste visa conhecer a porcentagem de efeito após o contato com o agente tóxico. Em uma cubeta foram adicionados 100 µL de SAO e 1 mL de amostra com posterior homogeneização. Em uma segunda cubeta colocou-se 100 µL de bactéria diluída 10 vezes, por fim, transferiu-se 0,9 mL para a cubeta contendo a bactéria. O tempo de exposição foi de 15 minutos com uma leitura intermediária em 5 minutos.

4.3.2 Protocolos para avaliação e identificação da toxicidade

4.3.2.1 Adição de EDTA

Em 6 tubos de centrifugação do tipo Falcon colocou-se 30 mL de amostra e pipetou-se os diferentes volumes de solução de EDTA 15,0 g L⁻¹ (Tabela 5). Em outros 6 tubos adicionou-se 30 mL de água do rio Jaguarí, branco analítico e da mesma forma que foi feito para as amostras, adicionou-se os mesmos volumes de solução de EDTA 15,0 g L⁻¹.

Tabela 5. Volumes da solução de EDTA 15,0 g L⁻¹ utilizados no teste de quelação com agente complexante, juntamente com a concentração final de EDTA adicionados

Tubos	Volume (μL)	Concentração (mg L ⁻¹)	Amostra (mL)	Volume de Branco (mL)
1	18,8	28,2	30,0	-
2	9,42	14,1	30,0	-
3	4,71	7,05	30,0	-
4	2,35	3,52	30,0	-
5	2,00	3,00	30,0	-
6	0,00	0,00	30,0	-
7	18,8	28,2	-	30,0
8	9,42	14,1	-	30,0
9	4,71	7,05	-	30,0
10	2,35	3,52	-	30,0
11	2,00	3,00	-	30,0
12	0,00	0,00	-	30,0

Fonte: Autoria própria

Após a adição de EDTA na amostra e no branco, os tubos foram mantidos sob leve agitação por 1 hora. Testes de toxicidade aguda em dose única usando o sistema Microtox[®] foram feitos em cada tubo contendo a amostra e o branco.

4.3.2.2 Adição de tiosulfato de sódio

Uma alíquota de 30 mL de amostra foi adicionada em 6 tubos tipo Falcon e em seguida, com auxílio de um micropipetador automático foram adicionados os volumes descritos na tabela 5 de solução de tiosulfato de sódio 1,62 g L⁻¹, preparada a partir de 81 mg do sal de tiosulfato de sódio e 50 mL de água ultrapura sendo que esta solução deve ser armazenada em tubos cônicos pretos opacos para evitar a degradação. Em outros 6 tubos Falcon distintos,

foram adicionados 30 mL de água do rio Jaguarí e adicionados os mesmos volumes de solução de tiosulfato de sódio listados na tabela 6. Após a adição dos respectivos volumes, os tubos foram agitados durante 1 hora e testes de toxicidade aguda em dose única do sistema Microtox[®] foram realizados em todos os tubos.

Tabela 6. Volumes de solução de tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) $1,62 \text{ g L}^{-1}$ adicionado às amostras e aos brancos com as concentrações.

Tubos	Volume (μL)	Concentração (mg L^{-1})	Amostra (mL)	Volume de Branco (mL)
1	393	20,9	30,0	-
2	196	10,5	30,0	-
3	98,4	5,24	30,0	-
4	49,2	2,62	30,0	-
5	24,6	1,31	30,0	-
6	0,00	0,00	30,0	-
7	393	20,9	-	30,0
8	196	10,5	-	30,0
9	98,4	5,24	-	30,0
10	49,2	2,62	-	30,0
11	24,6	1,31	-	30,0
12	0,00	0,00	-	30,0

Fonte: Autoria própria.

4.3.2.3 Gradação do pH

Em dois tubos cônicos de 50 mL cada, adicionou-se 30 mL de amostra. Em outros dois tubos adicionou-se 30 mL de água do rio Jaguarí, branco. O pH da amostra e dos brancos foram alterados adicionando ácido clorídrico 1 mol L^{-1} ou hidróxido de sódio 1 mol L^{-1} . Fixou-se o pH da amostra e do branco em 6,0 e 8,0, que corresponde a faixa de trabalho do teste toxicológico. Após 10 minutos, foram feitos testes de toxicidade na amostra manipulada.

4.3.2.4 Ajuste de pH e Filtração a vácuo

Com auxílio de uma proveta graduada, 690 mL da amostra foram transferidos para três erlenmeyers, 230 mL cada, em seguida, em um dos erlenmeyers foi adicionada a quantidade necessária de ácido clorídrico 1 mol L^{-1} para o pH da amostra atingir a faixa de 2-3. No erlenmeyer seguinte adicionou-se hidróxido de sódio 1 mol L^{-1} até o pH da amostra atingir o

intervalo 10-11. A leitura do pH foi realizada usando um medidor de pH calibrado na faixa de trabalho requerida. No terceiro erlenmeyer, por sua vez, foi medido o pH da amostra, sem qualquer adição de reagente. Vale ressaltar que um branco analítico foi adicionado às três manipulações realizadas, ou seja, foram adicionados ácido clorídrico utilizado na amostra, bem como a base hidróxido de sódio em uma água natural que não apresentava toxicidade. O branco analítico foi levado em conjunto com a amostra em toda manipulação realizada desde adição de reagentes até a realização de procedimentos mais sofisticados.

Um sistema de filtração a vácuo foi montado conforme ilustra a figura 21, em alguns casos foram adicionados um pré-filtro de fibra de vidro na montagem do filtro para impedir a saturação do filtro de 0,45 μm . Esta decisão foi tomada observando a quantidade de material suspenso e/ou precipitado formado. A amostra filtrada permaneceu armazenada no kitassato e 30 mL da cada amostra filtrada nas faixas de pH (ácida, base e inicial) foram transferidas para um tubo de centrifugação tipo Falcon e reservados para o teste de toxicidade.

Figura 21. Sistema de filtração a vácuo utilizado para filtrar a amostra dos rios Tietê, Pinheiros e Tamanduateí.

Fonte: Autoria própria

4.3.2.5 Extração em fase sólida

O sistema para extração em fase sólida foi montado conforme figura 19. Para cada faixa de pH uma fase específica foi escolhida: para faixas ácidas usou-se como fase os cartuchos tipo HLB, faixas neutras usou-se cartuchos tipo C₁₈ e finalmente faixas alcalinas utilizou-se cartuchos tipo HLB. Utilizou-se dois métodos padrões para extração: um para HLB, método 1694 da USEPA (2007) para determinação por HPLC/MS/MS de fármacos, e produtos de higiene pessoal em água, solo, sedimento e um para C₁₈, de acordo com o artigo científico publicado por Castillo e Barceló (1999) que propõe a extração por SPE de compostos orgânicos de diferentes classes com um foco maior em tensoativos, para explicar a toxicidade de um efluente industrial espanhol.

HLB

Inicialmente condicionou a coluna HLB passando 10 mL de metanol e 10 mL de água ultrapura com pH ajustado para faixa ácida (pH 3-2). Em seguida, 1 mL de metanol foi adicionado ao cartucho e recolhido em *vial* de 1,5 mL e este corresponde ao branco da coluna. Recondicionou-se novamente a coluna e 100 mL do branco acidificado foram passados pelo cartucho, onde foram recolhidos os 30 mL finais (B70) que passou pelo cartucho. Em seguida, sem deixar secar a coluna com os 200 mL filtrados da amostra restante filtradas iniciou-se a extração em fase sólida da amostra acidificada, retirou-se duas alíquotas de aproximadamente 30 mL da amostra que passou pela coluna em dois momentos distintos: o primeiro no início do procedimento após passado 80 mL (A80) e em um segundo momento, no final do procedimento, após 170 mL (A170) passados do volume total da amostra. A eluição ocorreu usando 2x 5 mL de metanol puro iniciado após a secagem da coluna em fluxo de N₂ por alguns minutos. A figura 22 representa, simplificada, o procedimento realizado na extração dos compostos orgânicos.

Figura 22. Esquema de eluição utilizando 10 mL de metanol após a eluição da amostra em pH ácido.

Obs: Foram utilizados duas porções de 5 mL de metanol, recolhidos em tubos de ensaio com tampas e vedados com parafilme e armazenados sob refrigeração.

Fonte: Adaptado CASTILLO; BARCELÓ(1999).

Em pH alcalino o procedimento foi semelhante com pequenas modificações, as soluções usadas no condicionamento devem estar na faixa de pH 10-11. Também se recolheu as frações A80 e A170 da amostra passada pela coluna, bem como a B70 referente ao branco analítico. No final da extração, eluiu-se a coluna com 6 mL de metanol seguidos de 2x 4,5 mL de ácido fórmico 2% ($v v^{-1}$) em metanol, após a secagem da coluna. A figura 23 exemplifica de forma simples o procedimento realizado na extração em fase sólida na faixa dos pH alcalino.

Figura 23. Ilustração da etapa de eluição dos composto retidos na coluna HLB.

Obs: Foram eluídos 2 porções de 3 mL de metanol e em seguida 2 porções de 4,5 mL cada de ácido fórmico 2% ($v v^{-1}$) em metanol. Os eluatos são armazenados em recipientes de vidros devidamente etiquetados e armazenados sob refrigeração.

Fonte: (CASTILLO; BARCELÓ, 1999) adaptado.

C₁₈

A ativação da fase estacionária iniciou-se com a adição de 10 mL de metanol e 10 mL de água ultra purificada em pH neutro (pH 7). 1 mL de metanol foi adicionado ao cartucho e recolhido posteriormente em *vial* de 1,5 mL, branco da coluna. Em seguida, reativou-se o cartucho de C₁₈ conforme descrito anteriormente e sem deixar a coluna secar iniciou-se a extração passando 100 mL do branco já filtrado e recolhendo os 30 mL finais (B70) em tubos cônicos para centrifugação tipo Falcon, rapidamente, iniciou-se a extração de 200 mL da amostra, recolhendo alíquotas em duas situações: uma após passados 80 mL (A80) e uma seguinte passados 170 mL (A170) do volume total da amostra e deixou-se o cartucho secar sob um fluxo de nitrogênio. A eluição do cartucho foi feita com adição de 2x 5 mL de hexano puro, em seguida 2x 5 mL de hexano/diclorometano (4:1, $v v^{-1}$) e 2x 5 mL de

metanol/diclorometano (9:1, v v⁻¹). A eluição da coluna C₁₈ está esquematizada de forma simples na Figura 24 bem como as frações recolhidas.

Figura 24. Esquema das misturas de solvente utilizadas para a eluição dos compostos retidos na coluna C₁₈, onde a fração A é composta por 10 mL de hexano, a fração B é composta por 10 mL de diclorometano/hexano na proporção de 4:1 (v v⁻¹) e a fração C corresponde a uma mistura de metanol/diclorometano (DCM) na proporção de 9:1 (v v⁻¹).

Fonte: (CASTILLO; BARCELÓ, 1999) adaptado.

O procedimento realizado neste trabalho foi feito nas três amostras estudadas e anteriormente ao teste com amostra real, no caso as amostras com rio Tamanduateí, Pinheiros e Tietê, e também foram testadas amostras fortificadas com substâncias tóxicas para o *Aliivibrio fischeri*. Este teste inclui desde as manipulações com EDTA e tiosulfato de sódio até a extração. As substâncias escolhidas para fortificar a amostra foram: AgNO₃, nitrato de prata para EDTA e tiosulfato, e fenol para a extração em fase sólida. Nestes ensaios foram utilizados padrões de referências químicos.

4.3.2.6 Aeração

Em 4 béqueres adicionou-se 30 mL das três amostras e em seguida montou-se o sistema de aeração. No béquer sobressalente adicionou-se 30 mL do branco, sem filtração. Para evitar o contato direto das mangueiras com a amostra conectou-se ponteiros nas extremidades. Tentou-se manter o fluxo de ar constante, regulando as válvulas quando necessário, o mesmo ocorrendo com a agitação. Fechou-se os béqueres com folhas de alumínio para se evitar contaminação com gotículas que ocasionalmente poderiam ser lançadas de um béquer para outro. Ao final de 1 hora, desligou-se o fluxo de ar e com auxílio de uma pipeta graduada transferiu-se o conteúdo do béquer para um tubo de centrífuga tipo Falcon, sendo que nesta etapa, evitou-se entrar em contato com a parede do béquer, pois após a transferência lavou-se

duas vezes as paredes da vidraria com metanol puro. Este metanol, por sua vez, foi armazenado para testes toxicológicos, posteriores, usando o sistema Microtox®.

O teste de aeração foi repetido algumas vezes e em todas elas trocou-se o filtro de ar 0,45 µm usado para impedir que contaminantes no ar ou eventualmente algum vestígio de óleo de bomba entrassem em contamine a amostra.

4.3.2.7 Recuperação da toxicidade a partir do eluato

Os eluatos coletados a partir da SPE, tabela 7, independentemente da coluna utilizada, foram secos em um concentrador de amostras e solubilizados em 10 mL de metanol puro. Assim, iniciou-se os testes de toxicidade utilizando os eluatos obtidos pela extração. Em um tudo de centrífuga tipo Falcon adicionou-se 20 mL da água do rio Jaguarí e pipetou-se 1,2 mL do eluato a ser analisado, completando o volume para 30 mL com a água do rio Jaguarí. Por fim, mediu-se o pH da amostra preparada, e, quando necessário o pH foi corrigido para faixa de trabalho do ensaio (6,5-8,5) com soluções de NaOH, ou HCl 1 mol L⁻¹. Em geral, Como o volume adicionado de ácido e base não deve ser muito grande, pois há risco de perda da informação toxicológica por diluição dos poluentes, optou-se por não ultrapassar 10% do volume total. Este procedimento foi realizado no mesmo dia do ensaio de toxicidade para se evitar perda de informação devido a degradação das substâncias.

Tabela 7. Solventes usados na extração em fase sólida, com as repectivas proporções em cada fase estacionária.

Fração	Solvente	Proporção (v v ⁻¹)	Fase Estacionária	pH
A	Hexano	-	C18	Neutro
B	Diclorometano/Hexano	4:1	C18	Neutro
C	Metanol/Diclorometano	9:1	C18	Neutro
D	Metanol	-	HLB	Ácido
E	Metanol	-	HLB	Básico
F	Metanol/Ácido Fórmico	1:50	HLB	Básico

Fonte: Autoria própria

Como no teste acima, pipetou-se 1,2 mL do metanol da lavagem obtido no final do procedimento da aeração em 20 mL de água de diluição, e completou-se o volume para 30 mL. O pH da amostra foi medido e, quando necessário, corrigido para a faixa de ideal do organismo-teste.

Os brancos, assim como os eluatos, foram secos no concentrador de amostras e solubilizados em 1 mL de metanol em *vials*. Em seguida, em tubos tipo Falcon de 15 mL, adicionou-se 1 mL de água de diluição e pipetou-se 120 µL do branco, completando o volume para 3 mL. O pH da amostra foi medido e corrigido, quando necessário.

4.4 Fluxograma Experimental

Os testes toxicológicos usando o sistema Microtox[®] foram realizados em menos de 24 horas após a manipulação. Apenas o eluatos obtidos da extração em fase sólida que foram armazenados por maior período de tempo, por estarem em solventes orgânicos e em baixa temperatura apresentam uma maior estabilidade química. O procedimento utilizado preconizava um teste de toxicidade aguda inicial realizado na amostra recém descongelada, iniciando-se assim as manipulações pertinentes ao TIE e, em menos de 24 horas após a abertura da amostra, eram realizados ensaios de toxicidade aguda nas frações e junto com as frações fazia-se novamente o teste de toxicidade aguda inicial nas amostras.

Os testes de toxicidade nos brancos foram feitos usando o protocolo de dose única, sendo que não deveria ultrapassar o valor de 20% de efeito na concentração máxima trabalhada de 89,1%, quando necessário, o teste foi refeito utilizando-se o protocolo de 9 diluições.

Para melhor visualizar todo o procedimento realizado neste trabalho, cinco fluxogramas estão organizados abaixo: A figura 25 trata do condicionamento do cartucho SPE, tanto C18 quanto HLB. A figura 26 ilustra a extração em fase sólida usando o branco, após o condicionamento. Na figura 27 ilustra a extração da fase sólida para a amostra e as figuras 28 e 29 tratam das adições de tiosulfato de sódio e EDTA, respectivamente.

Figura 25. Fluxograma da execução do condicionamento da coluna SPE, C18 e HLB e a retirada do branco da coluna. Este procedimento antecede a extração em fase sólida e na etapa 2 o pH da água ultra purificada é o mesmo pH em que se encontra a amostra.

Fonte: Autoria própria.

Figura 26. Fluxograma de extração em fase sólida (SPE) e filtração referente ao branco. A coluna deve ser condicionada conforme indicado a segura anterior.

Fonte: Autoria própria.

Figura 27. Fluxograma de extração da amostra e da eluição da coluna e filtração nas três faixas de pH trabalhados.

Fonte: Autoria própria. (*mesma coluna utilizada na extração do branco)

Figura 28. Fluxograma da adição de tiosulfato de sódio na amostra e no branco executados no mesmo instante. A adição de tiosulfato é crescente em cada fração.

Fonte: Autoria própria.

Figura 29. Fluxogramas de execução da adição do EDTA na amostra e no branco que foram executadas no mesmo instante. A adição do EDTA é crescente em cada fração.

Fonte: Autoria própria.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Qualidade sistema Microtox®

Antes do início dos testes de toxicidade aguda, foram realizados testes para verificar o desempenho do ensaio. Para isso, foram usadas soluções de referência e avaliada a diminuição da luminescência (efeito) decorrente da adição das soluções, após 30 minutos, em porcentagem de inibição. Além do desempenho como um todo, os ensaios com as soluções de referência foram decisivos para validar os resultados obtidos. Dentro do sistema da qualidade estabelecido pela CETESB, o resultado do teste das soluções de referência é válido quando se encontra dentro do limite superior e inferior das cartas controle. Cada solução tem sua carta controle feita com o resultado de 100 análises anteriores. Caso os critérios não sejam atendidos, todo o procedimento é refeito com um lote diferente de bactéria. Posteriormente, são refeitas as soluções de referência e as novas soluções de dicromato de potássio ($75,8 \text{ mgL}^{-1}$), sulfato de zinco ($6,16 \text{ mgL}^{-1}$) e fenol ($47,52 \text{ mgL}^{-1}$) são testadas e avaliadas frente a sua toxicidade.

As soluções de referência são muito tóxicas para o organismo-teste, *Aliivibrio fischeri*, e são comumente usadas em outros laboratórios, já que seu uso está bem estabelecido na Norma NBR 15411-3:2012, “Ecotoxicologia aquática – Determinação de efeito inibitório de amostras aquosas sobre a emissão da bioluminescência de *Vibrio fischeri* (ensaio de bactéria luminescente) Parte 3: Método utilizando bactéria liofilizadas” (ABNT NBR 15411-1, 2012). Este ensaio que antecede os testes com a amostra é de extrema relevância para assegurar a qualidade dos resultados analíticos. Os resultados obtidos e as cartas controles das soluções de referência são apresentados na figura 30:

Figura 30. Carta controle para a solução aquosa de (a) fenol, (b) dicromato de potássio e (c) sulfato de zinco

Obs: Os valores obtidos de porcentagem de inibição das 20 análises realizadas foram plotados ao longo do tempo após 30 minutos de exposição no sistema Microtox[®]. Os limites superior e inferior são

calculados multiplicando o desvio-padrão por 3 e somando o valor da média para o limite superior e subtraindo da média para o limite inferior.

Os limites foram estabelecidos usando cálculos estatísticos descritivos, o limite superior é estabelecido ao multiplicar por 3 o desvio-padrão e somar o resultado obtido com a média. Em paralelo, o limite inferior é obtido multiplicando por 3 o desvio-padrão e subtraindo o resultado da média

Na figura 30c observam-se os resultados obtidos para a solução de sulfato de zinco em todo andamento do trabalho. Há apenas um ponto, segundo ensaio realizado, fora dos limites estabelecidos pela carta controle. Como medida corretiva, o ensaio foi refeito no mesmo dia com um lote diferente de bactéria usando as mesmas soluções. O resultado obtido foi plotado - terceiro ponto -, e se apresentou dentro dos limites considerados adequados. Desta forma, deu-se prosseguimento nos testes. Os demais resultados das cartas controles, figura 30 “a” e “b”, não apresentaram um comportamento atípico, estando todos dentro dos limites e não foi observada tendências em nenhuma das cartas confeccionadas.

5.2 Toxicidade inicial dos rios e outros parâmetros

A primeira abordagem realizada foi medir a toxicidade inicial das amostras assim que recebidas. O valor de CE₂₀ para todas as amostras coletadas estão organizados na tabela 8. Os testes foram feitos no dia em que as amostras sofreram manipulação e no dia seguinte a manipulação, armazenadas em refrigeração por aproximadamente 24 h.

Tabela 8. Valores de CE₂₀ em porcentagem para os rios Tietê, Pinheiros e Tamanduateí.

Data	Rio	CE 20 em 15 minutos	I.C. (%)	Porcentagem efeito na concentração de 81,9%
05/10/2016	Pinheiros	6,885%	5,672-8,56	67,01%
06/10/2016	Pinheiros	4,533%	2,985-6,885	72,50%
18/10/2016	Pinheiros	12,42%	8,412-18,34	65,94%
20/10/2016	Pinheiros	3,031%	2,349-3,912	77,61%
25/10/2016	Pinheiros	4,126%	2,966-5,739	80,51%
26/10/2016	Pinheiros	4,837%	4,090-5,721	76,42%
11/11/2016	Pinheiros	3,677%	3,017-4,481	81,89%
01/12/2016	Pinheiros	2,820%	1,468-5,425	66,51%
09/12/2016	Pinheiros	6,491%	4,304-9,787	76,09%
23/12/2016	Pinheiros	20,83%	17,02-25,50	49,65%

Continua na página seguinte

Continuação da página anterior

13/01/2017	Pinheiros	15,42%	12,85-18,49	59,75%
01/09/2016	Tamanduateí	3,019%	1,757-5,188	57,33%
02/09/2016	Tamanduateí	8,369%	6,685-10,48	69,54%
22/09/2016	Tamanduateí	4,699%	4,178-5,284	58,48%
23/09/2016	Tamanduateí	9,610%	4,688-19,70	49,07%
01/12/2016	Tamanduateí	5,656%	4,714-6,785	53,03%
09/12/2016	Tamanduateí	26,50%	16,33-43,01	51,58%
09/12/2016	Tamanduateí	4,271%	2,828-6,452	60,18%
23/12/2016	Tamanduateí	23,30%	20,04-27,09	43,49%
11/10/2016	Tietê	16,79%	12,32-22,89	52,91%
14/10/2016	Tietê	5,251%	4,381-6,293	75,67%
18/10/2016	Tietê	10,29%	8,362-12,66	67,43%
20/10/2016	Tietê	5,409%	3,819-7,662	64,49%
25/10/2016	Tietê	6,227%	4,991-7,768	69,85%
26/10/2016	Tietê	5,741%	4,526-7,281	70,73%
11/11/2016	Tietê	2,790%	2,063-3,775	76,16%
01/12/2016	Tietê	25,56%	21,92-29,81	43,17%
23/12/2016	Tietê	46,73%	36,78-59,38	36,91%

Obs: Teste de toxicidade inicial em 15 minutos do sistema Microtox®. Os dados em parêntese evidenciam o intervalo de confiança (I.C.) determinado pelo próprio software. O CE₂₀ é calculado a partir de uma série de 9 diluições da amostra.

Fonte: Autoria própria.

Verificou-se que todas as amostras coletadas no segundo semestre de 2016 apresentaram alta toxicidade, uma vez que os valores obtidos de CE₂₀ estão abaixo de 20% com exceção da amostra do rio Tietê, que teve toxicidade de 46,73%. Entretanto, mesmo assim a amostra foi considerada para realização de manipulações, muito embora sua toxicidade estivesse acima de 20%. A toxicidade ao longo deste semestre permaneceu relativamente constante, abaixo de 20%. Algumas flutuações foram observadas, porém trata-se de alterações da mesma amostra devido degradação dos compostos.

Uma preocupação, explorada no documento da USEPA para o TIE (USEPA, 1991) é a estabilidade da amostra frente à forma de armazenamento usada. Optou-se em usar o congelamento da amostra, método esse já utilizado para outras amostras de rotina do ensaio e avaliou-se o tempo de estabilização (toxicidade) da amostra. Afigura 31 “a”, “b” e “c” apresenta os resultados confeccionados para estudar tal comportamento.

Figura 31. Toxicidade expressa em CE_{20} no sistema Microtox[®] em função do tempo, (a) rio Pinheiros, (b) rio Tietê e (c) rio Tamanduateí.

Obs: Após serem coletadas as amostras dos rios, estas foram particionadas em 8 frascos de 250 mL cada. A quantidade necessária para as manipulações era descongelada e o restante da amostra era

mantida no freezer e quando necessário novamente descongelada. O ensaio avaliou a estabilidade da amostra mantida congelada ao longo do tempo.

Observou-se que as amostras são estáveis quando mantidas congeladas por um período de um a dois meses. Após esse período, há um aumento na CE₂₀ que inviabiliza o uso da mesma, pois os compostos presentes na amostra provavelmente degradaram, mesmo armazenados em temperaturas negativas. Estabeleceu-se o prazo de 2 meses por amostra como validade, sendo ainda necessário a comprovação da toxicidade da amostra por um teste de toxicidade aguda usando o sistema Microtox[®].

As amostras coletadas segundo Tabela 4 não são tóxicas para o *A. fischeri*. Neste caso, a baixa toxicidade pode estar associada às condições pluviométricas, já que, as amostras foram coletadas em uma semana chuvosa, ou após chuva no dia anterior, e não apresentaram toxicidade. No momento da coleta foi anotado se houve chuva nas últimas 24 horas, as informações foram organizadas na Tabela 9.

Tabela 9. Cronograma com a informações pluviais nas últimas 24 horas

Rios	Março	Maio	Julho	Setembro	Novembro
Tietê	9 chuva	10 chuva	20 sem chuva	29 sem chuva	24 chuva
Pinheiros	30 sem chuva	19 chuva	13 sem chuva	14 sem chuva	29 chuva
Tamanduateí	3 chuva	18 chuva	28 sem chuva	21 chuva	9 sem chuva
Procedimento	EDTA e Na ₂ S ₂ O ₃		Extração em fase sólida Aeração		

O gráfico pluviométrico médio mensal referente ao ano do estudo indica que os meses de fevereiro, março, maio e junho apresentaram chuva muito acima da média. Nos demais meses, o índice ficou dentro do esperado, com exceção do mês de abril, julho e setembro que tiveram pouca chuva, mesmo comparando a média mensal (figura 32).

Figura 32. Gráfico pluviométrico da média mensal da UGHRI 6 – Alto Tietê do ano de 2016.

Fonte: (CETESB, 2016)

Os dados são médias de intensidade ao longo da região metropolitana com pontos de monitoramento próximos aos rios estudados, entretanto para as amostras que no dia anterior da coleta era reportado chuva, esta não apresentava toxicidade. Portanto, nem todas as amostras coletadas foram utilizadas para o desenvolvimento do trabalho. O rio que mais sofreu efeito de diluição foi o Tamanduateí.

Foram feitos testes na água natural coletada no rio Jaguari, não sendo observada toxicidade para o sistema Microtox[®]. A figura 33 apresenta os valores de porcentagem de efeito para diferentes concentrações da água natural do rio Jaguari.

Figura 33. Teste de toxicidade aguda em 5 e 15 minutos para as águas do rio Jaguari.

Obs: O teste de toxicidade foi realizado de forma análoga ao teste com as amostras. Foram testadas o total de nove diluições na amostra e cada uma foi lida pelo luminômetro, e a luminescência foi transformada em porcentagem de efeito.

As amostras coletadas e os pontos escolhidos pertencem ao sistema de monitoramento da CETESB, que engloba a determinação de muitos parâmetros químicos, como: alumínio dissolvido, alumínio total, arsênio total, bário total, cádmio total, carbono orgânico total e dissolvido, chumbo total, cloreto total, cobre dissolvido, cobre total, cromo total, DBO (5,20), fenóis totais, ferro dissolvido, ferro total, fósforo total, manganês total, mercúrio total, níquel total, nitrogênio amoniacal, nitrogênio Kjeldahl, nitrogênio nitrato, nitrogênio nitrito, óleos e graxas, potássio, sódio, sódio dissolvido total, sódio total, substâncias tensoativas que reagem com azul de metileno e zinco total; e os componentes orgânicos, benzeno, estireno, etilbenzeno, *m,p*-xileno, *o*-xileno e tolueno. E por fim, os parâmetros de campo, chuva nas últimas 24h, coloração, condutividade, oxigênio dissolvido, pH, temperatura da água e temperatura do ar. Os resultados obtidos para cada um dos parâmetros citados acima encontram-se no Anexo A, tabelas 23, 24 e 25 para os rios Tietê, Tamanduateí e Pinheiros, respectivamente.

A série dos metais totais e dissolvidos apresentam-se abaixo do limite de quantificação em alguns casos, no restante os resultados apresentados estão abaixo do esperado, o mesmo vale para os compostos orgânicos voláteis nos três rios com exceção do tolueno. Porém, os valores obtidos de DBO, carbono orgânico total e dissolvido, a série dos nitrogênios são elevados e denunciam que se tratam de rios altamente impactados pela poluição urbana, mais especificamente pelo esgoto não tratado.

Os dados podem ser agrupados utilizando um método estatístico chamado análise de agrupamento, que mede as distâncias entre os conjuntos de dados e com base nesse esquema de aglomeração, pode-se construir um gráfico em formato de árvore chamado de dendrograma que facilita a visualização das medidas de dissimilaridade (FÁVERO, 2017). As variáveis escolhidas para a análise de agrupamento foram nitrogênio nitrito, nitrogênio amoniacal, CE₂₀, tensoativos, óleos e graxas, carbono orgânico total e dissolvido. Estes parâmetros foram escolhidos, pois estão relacionados à poluição por esgoto urbano. O dendrograma gerado para os três rios estão apresentados nas figuras 34, 35 e 36:

Figura 34. Dendrograma para os parâmetros característicos de contaminação por esgoto urbano para o rio Tietê usando análise de agrupamento pelo método de Ward e distancias euclidianas.

Figura 35. Dendrograma para os parâmetros característicos de contaminação por esgoto urbano para o rio Tamanduateí usando análise de agrupamento pelo método de Ward e distâncias euclidianas.

Figura 36. Dendrograma para os parâmetros característicos de contaminação por esgoto urbano para o rio Pinheiros usando análise de agrupamento pelo método de Ward e distâncias euclidianas.

Os dendrogramas mostrados acima são muito parecidos, indicando uma semelhança no comportamento destas substâncias nos três rios. Na figura 34, um grupo composto por CE₂₀, nitrito e tensoativos é formado por serem próximos. Este comportamento indica que as variáveis estão, de certa forma, próximas em termos numéricos, construindo um *cluster*. Um segundo grupo pode ser formado pelas variáveis, óleos e graxas, nitrogênio amoniacal e carbono orgânico dissolvido e para esta figura, exclusivamente, o carbono orgânico total, uma vez que, as linhas horizontais de ligação entre as variáveis criam uma união com o *cluster* (óleo e graxa-amoniacal-carbono orgânico dissolvido) mais próximas em um nível mais elevado. Já nas figuras 35 e 36, a principal diferença está na existência de um *cluster* a mais, formado exclusivamente pelo carbono orgânico total, que se liga aos demais *clusters* no final, indicando uma proximidade com todas as outras variáveis.

O fato que mais chama a atenção é a constante do *cluster* (tensoativo-CE₂₀-nitrito) nas três figuras e a ligação das três variáveis no mesmo nível, ou seja, as três contribuem da mesma forma no seu *cluster*. A CE₂₀ é uma variável correlacionada positivamente com a

concentração de carbono orgânico total, uma vez que os metais não apresentam ter influência sobre a toxicidade (CETESB, 2017).

5.3 Avaliação e identificação da toxicidade

5.3.1 EDTA

Iniciou-se os testes com o EDTA medindo a toxicidade deste reagente ao sistema Microtox[®]. A determinação das concentrações de reagente utilizadas é uma etapa muito importante no desenvolvimento do TIE. Os reagentes ao serem utilizados não podem apresentar uma toxicidade maior que a da amostra, pois compromete a interpretação do resultado. Os resultados obtidos não foram conclusivos, já que não foi possível calcular o CE₂₀ para este reagente. Um gráfico de barras com os valores de porcentagem de efeito pela concentração de EDTA utilizada foi plotado para avaliar a toxicidade do reagente pela concentração de EDTA, (figura 37), porém a figura indica que todos os efeitos observados, não passaram de 20%, linha tracejada vermelha, condição esta que caracteriza que a amostra não apresenta toxicidade (a amostra é considerada tóxica para o sistema Microtox[®] quando o efeito tóxico na concentração máxima trabalhada, 81,9%, não ultrapassa os 20%). O efeito não aumenta conforme a concentração de EDTA aumenta no meio e, praticamente, o mesmo efeito é observado independente da concentração de EDTA.

Figura 37. Teste de toxicidade aguda do reagente EDTA usado para complexar metais

Obs: O ensaio consiste numa série de nove diluições de uma solução de EDTA 15 g L⁻¹. Após 15 minutos é feita a leitura da luminescência e o *software* converte em porcentagem de efeito. A linha tracejada marca o limite estabelecido (efeitos acima de 20% caracterizam amostras tóxicas e abaixo do 20% indicam amostras não tóxicas).

Os testes iniciais com o EDTA envolvem a fortificação do branco com um padrão NIST de chumbo. O objetivo deste teste é determinar a concentração ideal para o ensaio envolvendo a amostra. O EDTA complexa-se com a chumbo formando um composto muito estável e pouco tóxico para o Microtox[®], a concentração de chumbo na amostra é de 10 mg L⁻¹, concentração essa que apresentou um CE₂₀ em 15 minutos de 0,13 mg L⁻¹ e a porcentagem de efeito na concentração máxima trabalhada de prata foi 92,7% em 15 minutos de exposição. Os dados de toxicidade foram organizados em um gráfico de barras, apresentado na figura 38.

Figura 38. Resultado de toxicidade da água do rio Jaguarí fortificada com chumbo na concentração de 10 mg L⁻¹.

Obs: O resultado de CE₂₀ em 15 minutos foi de 0,13 mg L⁻¹ de prata e o teste de toxicidade foi realizado utilizando o protocolo de nove diluições da amostra e em seguida mediu-se a luminescência, por fim o software converteu a luminescência em porcentagem de efeito. A porcentagem de efeito na concentração de 8,19 mg L⁻¹ foi de 92,7%.

Em seguida, foi adicionado EDTA em diferentes concentrações para avaliar a toxicidade total das espécies de chumbo presentes frente às variações de concentração de EDTA. O resultado de tal experimento é ilustrado na figura 39.

Figura 39. Teste de toxicidade aguda para o branco fortificado com chumbo 10 mg L^{-1} e EDTA adicionado em diferentes concentrações.

Obs: O protocolo utilizado para executar o teste de toxicidade foi o de dose única onde avalia a luminescência na concentração máxima permitida pelo teste, 81,9%.

Os resultados obtidos para a adição de EDTA num branco fortificado mostra que na concentração de $28,2 \text{ mg L}^{-1}$ o chumbo não exerce mais efeito tóxico no organismo, indicando que todo o chumbo se complexou com o EDTA. Além do complexo Pb-EDTA não apresentar toxicidade, o possível excesso de EDTA também não é tóxico, já que o valor do efeito obtido na concentração de 28,2 é negativo (-11,05%). Nas demais concentrações o efeito observado foi de aproximadamente 83% de chumbo, incluindo a amostra que não teve a adição do EDTA. O resultado obtido neste teste indica que a faixa de trabalho de EDTA utilizada foi apropriada, uma vez que não se observou a toxicidade do reagente e o mesmo foi capaz de reagir com o metal presente reduzindo a toxicidade e uma vez que os metais presentes na amostra estão próximos desta ordem de grandeza.

Após determinar a faixa de concentração de EDTA e ver o comportamento do teste de toxicidade com EDTA, iniciou-se os testes com as amostras dos rios Tietê, Tamanduateí e Pinheiros. Os resultados obtidos para o rio Pinheiros encontram-se a seguir na figura 40.

Figura 40. Teste de toxicidade aguda com EDTA na amostra do rio Pinheiros

Obs: O teste consiste em adicionar gradativamente o reagente na amostra e comparar com os efeitos obtidos na concentração máxima de 81,9%. No dia seguinte, o teste foi repetido com concentrações mais elevadas de EDTA.

Na figura 40, os resultados obtidos não apresentaram diferença na porcentagem de efeito, desta forma foi realizado um outro teste com concentrações mais elevadas de EDTA (62,5; 125; 250 e 500 mg L⁻¹), sendo que o o resultado obtido foi plotado junto com o anterior. Nele, observa-se um leve aumento da toxicidade conforme a concentração de EDTA aumenta, este aumento possivelmente é acarretado pela toxicidade do reagente.

Uma forma de verificar diferenças significativas a nível estatístico é utilizar o teste-t de *Student*, comparando os valores de porcentagem de efeito das amostras com EDTA com o valor de porcentagem de efeito sem o reagente. As hipóteses testadas são as seguintes: (nula) $H_0: \sigma =$ as porcentagens de efeito são todas iguais, (alternativa) $H_1: \sigma >$ as porcentagens de efeito são diferentes, onde $\sigma = 0,025$ para teste unilateral, ou $\sigma = 0,05$ para teste bilateral (FÁVERO, 2017). Os valores de significância, o valor de t e todas as demais variáveis estão organizados na tabela 10.

Tabela 10. Valores de significância em 1 extremidade (probabilidade associada) para o teste *t* de *Student* para o rio Pinheiros.

	t	Significância 1 extremidade	Diferença média	95% intervalo de confiança da diferença		Valor teste
				Inferior	Superior	
1º dia	-2,292	0,053	-2,207	-5,2731	0,8581	47,23
2º dia	-0,455	0,340	-1,330	-10,635	7,9752	35,87

O teste consiste, basicamente, em comparar os valores. Para um teste unilateral, a significância é 0,053 para o primeiro dia, e 0,340 para o segundo dia. Como $0,053 > 0,025$ e $0,34 > 0,025$, aceita-se a hipótese nula, conclui-se, portanto, que ao nível de confiança de 95%, as porcentagens de efeito são iguais, logo não houve mudanças na toxicidade para ambos os casos. O mesmo foi feito para o rio Tietê, e os resultados estão apresentados na figura 41 e na tabela 11:

Figura 41. Teste de toxicidade aguda com EDTA na amostra tóxica do rio Tietê.

Obs: O teste, em resumo, consiste em determinar a porcentagem de efeito tóxico da amostra em diferentes concentrações de EDTA.

Tabela 11. Valores de significância em 1 extremidade (probabilidade associada) para o teste *t* de *Student* para o rio Tietê

t	Significância 1 extremidade	Diferença média	95% intervalo de confiança da diferença		Valor teste
			Inferior	Superior	
-0,811	0,2315	-0,810	-3,5818	1,9618	36,91

Assim como feito para o rio Pinheiros, os valores de porcentagem de efeito, referente a concentração de 81,9%, estão muito próximos, no entanto, há uma leve diminuição do efeito na concentração mais elevada de EDTA, o que pode sugerir que metais presentes em pequena quantidade foram quelados pelo complexante. No entanto, ao se observar o teste *t*, observa-se que a significância é de 0,2315, logo $0,2315 > 0,025$, aceita-se a hipótese nula, portanto, não existe diferenças entre as medidas e o valor teste, não havendo uma diminuição estatisticamente aparente da toxicidade.

Não foi possível realizar os testes com o EDTA para o rio Tamanduateí, uma vez que o rio em questão não apresentou toxicidade frente ao sistema Microtox[®] na concentração de 81,9%. Como citado anteriormente, tanto para as manipulações com EDTA, tiosulfato e gradação de pH não foi possível avaliar a toxicidade com relação aos metais e agentes oxidantes.

As tabelas incluídas no anexo desta dissertação indicam que as concentrações de metais tóxicos como chumbo, zinco, cádmio estão abaixo dos limites de quantificação estabelecidos pelo método analítico utilizado e também estão abaixo dos limites preconizados pela legislação brasileira, Resolução CONAMA 357 (BRASIL 2005), para rios de classe 4 (muito impactado), classe onde se enquadram os rios em questão. Logo, é esperado que as manipulações que avaliam a presença de metais apresentem os resultados aqui obtidos.

5.3.2 Tiosulfato de sódio

O tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) é um reagente utilizado nas reações de oxirredução como oxidante. Os principais compostos que reagem com o tiosulfato de sódio são os halogênios com exceção do flúor, alguns metais também. Também pode coordenar-se com metais representativos como a prata e formar complexos (VOGEL, 1981). A abordagem usada no EDTA, também foi aplicada ao tiosulfato de sódio. Inicialmente fez-se os testes de toxicidade do reagente para determinação da faixa de concentração onde o tiosulfato não é

tóxico, porém capaz de reagir com as espécies presentes na amostra. E em seguida, o reagente foi adicionado às amostras nas concentrações anteriormente definidas.

O teste foi realizado em três concentrações (3,072; 6,142 e 12,28 g L⁻¹) a partir da solução mãe de tiosulfato de sódio de 15 g L⁻¹. A figura 44 ilustra os resultados de efeito pelas concentrações de tiosulfato de sódio.

Figura 42. Teste de toxicidade do tiosulfato de sódio em três concentrações diferentes.

Obs: O teste consiste na adição de tiosulfato de sódio no diluente e em seguida foram realizadas nove diluições seriadas. A luminescência foi medida nas nove cubetas e foram calculados os valores de CE20 em 15 minutos de exposição. A linha tracejada marca o valor estabelecido que considera a amostra tóxica, >20%.

A figura 44 indica que o tiosulfato de sódio tem uma baixa toxicidade para o *A. fischeri*, as demais diluições não apresentaram efeito tóxico, uma vez que a bactéria não mostrou uma diminuição da sua luminescência natural mesmo sendo exposta às altas concentrações de tiosulfato de sódio, embora em algumas concentrações o efeito não exceda os 20% de efeito, o que também caracteriza o reagente como não tóxico nestas concentrações. Assim, não foi possível calcular o valor de CE20 para este composto.

Como as concentrações de tiosulfato de sódio testadas foram muito elevadas, decidiu-se diminuir a concentração desse reagente para a ordem de miligrama por litro, já que os compostos que reagem com o tiosulfato de sódio estão em concentrações mais baixas. Assim como no caso do EDTA, fortificou-se o branco com um padrão NIST de nitrato de prata. A

prata é um metal tóxico para a *A. fischeri* e as reações que envolvem a prata com o tiosulfato são bem conhecidas. A toxicidade do branco fortificado com prata 10 mg L⁻¹ encontra-se ilustrada na figura 43:

Figura 43. Teste de toxicidade para determinar a CE₂₀ do branco fortificado com prata 10 mg L⁻¹ após 5 e 15 minutos de exposição.

Obs: Após o preparo do branco fortificado, usou-se o protocolo de nove diluições para confeccionar a curva dose-resposta e assim determinar a concentração efetiva capaz de causar o efeito em 20%.

A CE₂₀ calculada foi de 0,323 mg L⁻¹ após 15 minutos de exposição. A amostra apresentou uma elevada toxicidade para a substância testada. Foram separadas seis porções do branco fortificado com prata 10 mg L⁻¹ e em cinco delas adicionou-se quantidades distintas de tiosulfato de sódio, para avaliação do efeito em porcentagem de cada solução. Conforme pode ser observado na figura 44, houve uma diminuição da toxicidade a partir da concentração de 10,49 mg L⁻¹ com valor negativo de efeito (-12,35%), que se manteve na concentração seguinte. A prata solúvel em solução reage com o tiosulfato formando um complexo solúvel de ditiosulfatoargentato [Ag(S₂O₃)₂]³⁻. Paralelamente, observou-se a formação de um precipitado preto em alguns tubos, que segundo Vogel (1981) corresponde ao sulfeto de prata, Ag₂S, oriundo da instabilidade do precipitado de tiosulfato de prata, Ag₂S₂O₃ (decomposição hidrolítica).

Figura 44. Teste de toxicidade aguda com branco fortificado com prata em diferentes concentrações de tiosulfato de sódio.

Após estabelecer a faixa de concentração de tiosulfato de sódio, iniciou-se as manipulações com as amostras do rio Pinheiros e Tietê. A figura 45 ilustra os resultados obtido para o rio Pinheiros (a) e Tietê (b), respectivamente:

Figura 45. Teste de toxicidade aguda com amostras do (a) rio Pinheiros e (b) Tietê em diferentes concentrações de tiosulfato de sódio

Obs: A amostra é colocada em contato com o organismos-teste e medida sua luminosidade após 5 e 15 minutos de exposição.

* valor estatisticamente diferente do valor teste de 50,25 no teste *t* de *Student*.

Na figura 45 (a), percebe-se que a partir da concentração de 2,62 mg L⁻¹ houve uma diminuição de toxicidade gradativa conforme a concentração aumenta de 9% sendo que o máximo obtido foi na concentração de 20,98 onde o efeito diminuiu 33%. Na figura 45 (b) não se observa nenhuma alteração no efeito quando é adicionado tiossulfato na amostra em questão. Para avaliar a diminuição em níveis de significância, usou-se o teste *t* de *Student*, onde as hipóteses são: H₀: σ = as porcentagens de efeito são todas iguais, (alternativa) H₁: σ > as porcentagens de efeito são diferentes ($\sigma = 0,025$ unilateral e $\sigma = 0,05$ bilateral). A tabela 12 apresenta os valores de probabilidade associada a significância dos dois rios:

Tabela 12. Valores de significância em 1 extremidade (probabilidade associada) para o teste *t* de *Student*.

Rio	<i>t</i>	Significância 1 extremidade	Diferença média	95% intervalo de confiança da diferença		Valor teste
				Inferior	Superior	
Pinheiros	-2,683	0,0027	-7,916	-16,107	0,2747	50,25
Tietê	-3,026	0,047	-2,567	-6,2168	1,0834	30,15

Para o rio Tietê observa-se que o nível de significância apresentado para o teste unilateral é de 0,047, valor superior a 0,025, o que permite aceitar a hipótese nula dos valores de efeito serem iguais antes e depois da adição de tiossulfato. Já no rio Pinheiros, o nível de

significância é de 0,0027, valor inferior a 0,025, desta forma, rejeita-se a hipótese nula (H_0) e aceita-se a alternativa H_1 , onde considera os valores de efeito antes e depois da adição.

Em resumo, uma diminuição de 33% foi observada na concentração de 20,98 mg L⁻¹ para o rio Pinheiros, e os testes estatísticos corroboram com as observações feitas, indicando uma diminuição do efeito causado pela adição do tiosulfato. Tal aspecto indica a presença de oxidantes não metálicos, uma vez que o teste com EDTA não apresentou mudança na toxicidade. No rio Tietê, não houve alteração de seu efeito tóxico em nenhuma das concentrações de tiosulfato de sódio testadas.

5.3.3 Gradação do pH

Todo organismo-teste tem um faixa ótima de pH. O teste de gradação de pH consiste em trabalhar no limite desta faixa, e pegar assim os compostos químico que são levemente ionizados, ou que se dissociam. A faixa de pH da *A. fischeri* é 6,5 a 8,0. Desta forma ajustou-se o pH das amostras para aproximadamente próximo dos valores limites, os resultados obtidos estão organizados nas figuras 46 e 47:

Figura 46. Resultados de gradação de pH do rio Tietê para os limites da faixa de trabalho do organismo-teste e os respectivos brancos.

Figura 47. Resultados de gradação de pH do rio Pinheiros para os limites da faixa de trabalho do organismo-teste e os seus respectivos brancos.

A tabela 13 apresenta os resultados do teste *t* para amostras emparelhadas comparando os valores médios de efeito tóxico.

Tabela 13. Resultados estatísticos referente ao teste *t* de *Student* para amostras emparelhadas, comparando os valores médios de efeito tóxico (5 e 15 minutos) dos pares: amostra e gradação em diferentes valores de pH.

Rio	Par	Média	Desvio Padrão	Erro padrão médio	<i>t</i>	Significância - 2 extremidades
Tietê	Gradação pH 6,45	7,305	3,41	2,415	3,025	0,203
	Gradação pH 7,79	19,28	1,07	0,760	25,37	0,025
Pinheiros	Gradação pH 6,43	39,32	37,6	26,57	1,479	0,378
	Gradação pH 8,06	47,67	30,6	21,66	2,201	0,270

Usou-se uma nova abordagem estatística para comparar os valores de efeito tóxico, antes e depois da manipulação. Conhecida como Teste *t* de *Student* para amostras emparelhadas, ela é usualmente utilizada para casos de comparação dos valores médios em pares específicos, diferente do caso anterior que comparava o valor teste para cada caso. A interpretação do valor de significância permanece a mesma. As hipóteses são, H_0 : O valor de efeito entre a amostra antes e depois da manipulação é o mesmo, H_1 : O efeito observado antes é diferente que o observado depois da mudança do pH. Para um nível de confiança de 95% a significância é de 0,05.

Observou-se que em todos os casos o valor de significância é maior que 0,05, indicando que não houve alteração no efeito após a manipulação. Apenas em um caso apresentado observou-se um valor inferior à 0,05 (0,025) para a o rio Tietê gradação em pH 7,79. Este valor sugere que houve diferenças no valor de efeito da amostra antes e depois da manipulação.

Os compostos associados à gradação do pH são espécies químicas que sofrem reações ácido-base e de alguma forma se tornam indisponíveis, seja precipitando, ou degradando-se. Porém, nenhuma manipulação resultou em diminuição absoluta da toxicidade da amostra, sendo observadas apenas diminuições pontuais. Uma forma mais concreta de observar o efeito do pH na toxicidade e nos compostos é alterar este parâmetro e associar a filtração removendo material particulado, ou possíveis compostos que tenham sofrido precipitação. As amostras do rio Tamanduateí começaram a apresentar toxicidade e, portanto, foi possível realizar com elas as manipulações restantes.

5.3.4 Ajuste de pH e Filtração à vácuo

Muitas substâncias químicas apresentam regiões em suas estruturas que reagem com íon hidrônio (H^+) ou o íon hidroxila (OH^-) presente em abundância em ácido e bases, respectivamente. Ao reagirem com estas espécies, as propriedades químicas destas substâncias são alteradas, e toda dinâmica da solução se modifica. A precipitação é um dos fenômenos influenciada pelo pH da solução, porém não é a única que ocorre, sendo também observadas reações de oxirredução governadas pelo pH e outras propriedades químicas. A filtração por sua vez é um método de separação física para sólidos insolúveis e líquido, muito acessível e barato, sendo mundialmente muito utilizada em laboratórios. Ela separa o sólido do líquido usando uma membrana com uma porosidade apropriada restando o sólido na membrana para facilitar um vácuo pode ser aplicado no sistema, e desta forma favorecer a passagem da mistura líquido-sólido pela membrana. O líquido por sua vez é transferido para um frasco coletor, enquanto o sólido permanece retido na membrana.

Nesta etapa do trabalho associou-se estes dois métodos para retirar as substâncias insolúveis presentes na amostra nas faixas de pH ácido, básico e inicial. Entende-se como pH inicial, o pH em que se encontra a amostra inicialmente, sem adição de qualquer ácido ou base. Os resultados obtidos para o rio Tietê estão organizados na figura 48:

Figura 48. Valores médios (n=2; n=1, pH Básico) de CE₂₀ em 15 minutos de exposição da água bruta do rio Tietê e da mesma amostra filtrada em uma membrana 0,45 µm de porosidade, pH da amostra e a data da execução da manipulação.

Obs: Os resultados apresentados foram obtidos usando o protocolo de nove diluições em série para confeccionar a curva dose-resposta e desta forma obter o CE₂₀.

Em todos os pH trabalhados o valor de CE₂₀ calculado após a filtração é maior que o CE₂₀ da amostra sem sofrer qualquer alteração. Esse aumento da CE₂₀ significa, em termos práticos, que a toxicidade após a filtração em todos os pH foi reduzida. As amostras trabalhadas nesta etapa do projeto apresentavam uma quantidade grande de material suspenso que, após a filtração, ficou retido no filtro. Mesmo o resultado sendo expressivo, qualitativamente e quantitativamente, como pode ser posteriormente observado, a toxicidade não foi reduzida totalmente, ou seja, como já indicava as outras manipulações, trata-se de uma mistura muito complexa de substâncias tóxicas presentes no rio Tietê. Para avaliar a expressividade da diminuição da toxicidade da amostra frente à filtração realizou-se o teste *t* para uma amostra. Os resultados do teste *t* de *Student* estão apresentados na tabela 14:

Tabela 14. Comparação dos resultados de toxicidade (CE_{20} em 15 min.) entre amostra bruta com as frações filtradas em meio ácido, básico e neutro do Rio Tietê.

pH	Média Filtração	D. Padrão Teste Inicial	D. Padrão Filtração	n Teste Inicial	n Filtração	Valor t	Significância
Ácido	0,4629	0,0025	0,1255	3	2	-6,168	0,0086
Inicial	0,2864	0,0025	0,1111	3	2	-3,955	0,0288
Básico	0,1554	0,0025	-	3	1	-34,88	0,0008

Em todos os casos a significância está abaixo de 0,05 indicando que, da mesma forma que anteriormente, a hipótese nula neste caso é descartada e assume-se a hipótese alternativa dos valores serem diferentes.

Os resultados obtidos para o rio Tamanduateí estão ilustrados na figura 49 e tabela 15:

Figura 49. Valores médios (n=2; n=1, pH Básico) de CE_{20} em 15 minutos de exposição da água bruta do rio Tamanduateí e da mesma amostra filtrada em uma membrana 0,45 μ m de porosidade.

Obs: Os resultados apresentados foram obtidos usando o protocolo de nove diluições em série para plotar a curva dose-resposta e desta forma obter o CE_{20} .

Tabela 15. Comparação dos resultados de toxicidade (CE_{20} em 15 min.) entre amostra bruta com as frações filtradas em meio ácido, básico e neutro do Rio Tamanduateí.

pH	Média Filtração	D. Padrão Teste Inicial	D. Padrão Filtração	n Teste Inicial	n Filtração	valor-t	Significância
Ácido	0,4174	0,0277	0,0721	3	2	-8,148	0,0039
Inicial	0,1288	0,0277	0,0144	3	2	-2,893	0,0629
Básico	0,0810	0,0277	-	3	1	-0,496	0,6691

Os resultados aqui apresentados para o rio Tamanduateí indicam que a filtração não é tão efetiva na diminuição da toxicidade, e, embora se observe uma pequena diminuição desta toxicidade, é pouco significativa, principalmente no pH inicial em que a diminuição é mais visível. A significância maior que 0,05 para a pH inicial e básico (em negrito) impede que a hipótese nula seja descartada e desta forma, os valores de CE_{20} antes e depois da filtração são estatisticamente iguais. Porém, em pH ácidos há uma diferença significativa dos valores de CE_{20} antes e depois da filtração, observada tanto na figura quanto pelos cálculos estatísticos.

Por fim, os resultados da CE_{20} para o rio Pinheiros encontram-se na figura 50 e tabela 16:

Figura 50. Valores médios (n=2; n=1, pH Básico) de CE_{20} em 15 minutos de exposição da água bruta do rio Pinheiros e da mesma amostra filtrada em uma membrana 0,45 μ m de porosidade.

Obs: Os resultados apresentados foram obtidos usando o protocolo de nove diluições em série para plotar a curva dose-resposta e desta forma obter o CE_{20} .

Tabela 16. Comparação dos resultados de toxicidade (CE_{20} em 15 min.) entre amostra bruta com frações filtradas em meio ácido, básico e neutro do Rio Pinheiros.

pH	Média Filtração	D. Padrão Teste Inicial	D. Padrão Filtração	n Teste Inicial	n Filtração	valor-t	Significância
Ácido	0,2729	0,0149	0,0045	5	2	-20,29	0,0001
Inicial	0,2024	0,0149	0,0578	5	2	-6,526	0,0013
Básico	0,1374	0,0149	-	5	1	-5,742	0,0046

Na figura 50, observa-se um aumento da CE_{20} após a amostra ser filtrada em todos os pH testados, o que caracteriza uma diminuição da toxicidade como um todo, logo a filtração se mostrou capaz de diminuir a toxicidade nas faixas ácidas e básicas. Em níveis estatísticos, a significância no teste *t* de *Student* ficou abaixo de 0,05, logo a hipótese nula é rejeitada em detrimento da alternativa, que assim como nos casos anteriores, diz respeito aos valores de CE_{20} serem diferentes, antes e depois da filtração.

Os três rios estudados tiveram sua toxicidade afetada de alguma forma pela filtração. A retirada do material suspenso, comumente encontrado nas amostras, é responsável por parte da toxicidade total da água dos rios. Este material tem origem incerta, uma vez que os rios estão muito expostos tanto pelo lançamento de esgoto (alto teor de carbono orgânico e alto teor de sólidos, como pode ser observado nas tabelas do anexo A) e também pela poluição atmosférica na queima de combustíveis e o próprio sedimento do rio. A faixa de pH trabalhada é indiferente para a toxicidade, com exceção do rio Tamanduateí, uma vez que em pH ácidos ou alcalinos observou-se a diminuição desta toxicidade. O rio Tamanduateí não apresentou diminuição de toxicidade como os demais, apenas em meio ácido houve uma diminuição o que indica presença de compostos químicos ionizáveis. Já nos rios Tietê e Pinheiros a presença de compostos não-ionizáveis parece mais aparente uma vez que não foram observadas mudanças no comportamento da amostra filtrada quando alterando o pH.

Paralelamente aos testes de toxicidade com a amostra sem manipulação e a amostra filtrada, foram realizados os testes com o branco (água do rio Jaguari). Os mesmos procedimentos executados na amostra foram repetidos no branco. Os resultados mostram que não houve qualquer mudança na toxicidade do branco antes e depois da filtração, indicando que não há contaminação da amostra pelo filtro e de outra origem. Os resultados do branco são apresentados na tabela 17:

Tabela 17. Efeito tóxico dos brancos após a filtração em pH ácido, básico e inicial na concentração máxima permitida pelo Sistema Microtox®, 81,9%.

Efeito em 5 minutos (%)	Efeito em 15 minutos (%)	Faixa de pH
3,340	3,857	Ácido
5,446	6,850	
-4,218	-4,681	
8,066	12,02	
-4,128	-2,880	
-5,077	-2,753	
4,083	-1,692	Básico
2,819	2,397	
-1,375	2,087	
3,447	2,270	Inicial
4,617	3,646	
12,48	13,74	
8,112	4,841	
-33,47	-23,03	
-6,377	-8,693	

Obs: Após a manipulação em sua respectiva faixa de pH, o pH do branco é reajustado para a faixa de trabalho do organismo-teste e desta forma o teste é realizado em protocolo dose-única.

Os dados de filtração corroboram com os dados de monitoramento ambiental feito pela CETESB (Anexo A). Os valores de sólidos totais para os três rios são altos, na faixa de 200 a 500 mg L⁻¹.

5.3.5 Extração em fase sólida

A extração em fase sólida é uma técnica de extração e pré-concentração da amostra muito eficiente e simples e é baseada em princípios cromatográficos. O manual da USEPA para execução do TIE sugere cartuchos tipo C18 que são preferíveis para compostos mais apolares, já que as longas cadeias de 18 carbonos apresentam um caráter mais hidrofóbico. Uma limitação muito encontrada em cartuchos C18 disponíveis é o baixo rendimento em regiões ácidas e alcalinas, já que nestas regiões de pH há uma intensa atividade de íons que apresentam baixa afinidade pela cadeia de octadecil, além de amostras muito ácidas ou muito básicas serem capazes de dissolver a sílica, base da fase estacionária. Em contrapartida, hoje em dia há um número muito grande de fases estacionárias disponíveis no mercado, com diferentes propriedades e com afinidade por inúmeros compostos. HLB - Coluna balanceada hidrofílico-lipofílico de fase reversa são muito versáteis, uma vez que possuem sítios de

interação com moléculas polares e apolares em sua estrutura. Amostras muito ácidas ou muito alcalinas não são capazes de dissolver a base polimérica da fase HLB, sendo muito recomendada na extração de diferentes compostos nesta faixa de pH. A figura 51 foi retirada de um catálogo e compara a fases estacionárias C18 e HLB em termos de fator de retenção e conclui-se que a faixa ótima de operação da C18 é a faixa neutra levemente ácida e para a HLB uma faixa maior de pH (0~14). No método da USEPA há uma forte recomendação em usar outros tipos de fases estacionárias. Portanto, optou-se em usar as fases HLB para as faixas ácidas e alcalinas e para a faixa neutra manteve-se o uso da C18 conforme recomenda o protocolo da USEPA.

Figura 51. Curva teórica de fator de retenção em função do pH da amostra e as faixas recomendáveis de trabalho das duas fases estacionárias, C18 e Oasis® HLB.

Fonte: (WATERS CORPORATION, 2014)

Os rios Tietê, Pinheiros e Tamanduateí são altamente impactados pela urbanização e espera-se que uma quantidade muito grande de substâncias químicas de origem diversa seja responsável pela toxicidade, embora hoje a maior parte da poluição destes rios tem origem no esgoto não tratado. Os métodos de extração têm que refletir essa pluralidade de substâncias, deste modo, escolheu-se trabalhar com métodos mais abrangentes, sendo que um deles é protocolo da USEPA (2007) que descreve a determinação e extração usando cartuchos de SPE do tipo HLB para fármacos, produtos de higiene pessoal e cosméticos em água, e em outras matrizes. O método também trabalha com variação do pH da amostra na faixa ácidas e alcalinas. Já os cartuchos do tipo C₁₈ o método descrito foi retirado de um artigo científico publicado em 1999, onde Castillo e Barceló descrevem a identificação de compostos tóxicos polares em efluente industrial usando fracionamento e cromatografia líquida acoplada à

espectrometria de massas. Os autores avaliam por meio do fracionamento químico a toxicidade das frações obtidas pela extração sequencial usando cartuchos de C18, Iso ENV+ (uma fase estacionária com afinidade maior por compostos polares). As classes de compostos detectados por LC/MS foram: tensoativos não iônicos, compostos fenólicos, derivados de ftalatos, naftalenos sulfonados e sulfonato de alquilbenzeno linear (LAS). Trata-se de um método muito abrangente e utilizado por outros grupos de pesquisa na extração de água muito impactadas como descrito por Farré e colaboradores (2001) em seu artigo no estudo da inibição da bioluminescência por tensoativos no ensaio do Microtox[®] em um equipamento análogo chamado Toxalert[®] (FARRÉ, GARCÍA, *et al.*, 2001).

As amostras foram filtradas antes da extração como medida preventiva, uma vez que as partículas em suspensão podem obstruir a passagem da amostra pelo cartucho. Uma forma de avaliar o andamento da retenção, que consiste na saturação do cartucho pelo excesso de compostos, é retirar alíquotas em dois momentos na extração. O método da USEPA sugere a primeira alíquota na metade do volume total da amostra, no caso 100 mL e a última no final do processo da extração, os 30 mL finais. Portanto, ao se realizar os testes toxicológicos com o sistema Microtox[®], há duas frações descritas A80 e A170 de 30 mL cada. Os resultados obtidos foram organizados na figura 52:

Figura 52. Resultados de toxicidade obtidos após realizar a extração em fase sólida para a amostra dos rios (a) Tietê, (b) Pinheiros e (c) Tamanduateí.

Obs: As frações A80 e A170 representam respectivamente, alíquotas de 30 mL cada, recolhidas após 80 mL da amostra passada e os últimos 30 mL finais. Os valores de inibição são referentes a concentração máxima permitida pelo teste de 81,9%.

Em todas as ilustrações da figura 52 observa-se uma diminuição visível da toxicidade da amostra após a extração, independente da fase estacionaria usada, ou da faixa de pH testada. Os valores obtidos e plotados referem-se à inibição da bioluminescência na concentração máxima de 81,9%. Há alguns valores positivos de inibição, mas todos abaixo de 20%, que

segundo ABNT NBR 15411-1 (2012) e CETESB (2016), caracteriza a amostra como não-tóxica.

Embora outras manipulações realizadas tenham diminuído a toxicidade da amostra como a filtração e a adição de tiosulfato de sódio, somente a SPE foi capaz de reduzir toda a toxicidade da amostra. Os compostos orgânicos são os principais grupos de compostos a serem retidos nos cartuchos de SPE. O tipo da fase usada sugere a polaridade das substâncias retidas, a coluna Oasis® HLB retém compostos polares e apolares, já que em sua estrutura há sítios de interação para esses dois tipos de compostos. Já o cartucho C18 retém compostos apolares. A extração usando C18 em pH inicial, teve o mesmo desempenho que o cartucho de caráter anfótera, HLB, portanto, os compostos retidos são majoritariamente apolares, ou apresentam características apolares. O pH em que a amostra foi extraída também indica que o composto orgânico em questão não sofre ionização e nem dissociação em pH alcalino, pois independente do pH testado não houve qualquer alteração no rendimento da extração, indicando que se trata de uma molécula não ionizável, ou seja, não possui, aparentemente, sítios ácido-base na sua estrutura.

As frações eluídas foram armazenadas e os solventes considerados muito tóxicos para a *Allivibrio fischeri* foram trocados por metanol para o teste de recuperação da toxicidade a partir do eluato.

Foram também realizados testes toxicológicos com o branco dos cartuchos. O objetivo de recolher uma fração em metanol da coluna apenas condicionada é garantir que nenhum composto possa estar contaminando a amostra. Os resultados obtidos dos brancos estão apresentados na figura 53. Cada extração realizada gerava um branco que era nomeado de acordo com a data de sua realização. Os resultados apresentados indicam que nenhum composto tóxico foi transferido para a amostra no momento da extração. A fração de branco A80, que representa o branco analítico, também não apresentou resultados quanto a sua toxicidade.

Figura 53. Efeito tóxico dos brancos da coluna realizando no início, após o condicionamento da coluna.

Obs: Cada extração gerava um branco que era nominado com o dia em que a extração foi efetuada.

5.3.6 Aeração

Muito embora a aeração seja um teste importante na avaliação e identificação da toxicidade de uma amostra, trata-se da manipulação tecnicamente mais complexa. Há um número muito grande de variáveis nesta manipulação e todas devem ser muito bem controladas para que os resultados obtidos reflitam a característica da amostra.

A aeração é comumente utilizada em testes ecotoxicológicos com a finalidade de manter os níveis ótimos de oxigênio para os organismos-teste. No TIE, ela é utilizada para detectar a presença de compostos voláteis e tensoativos. E pode ser realizada em três faixas de pH; ácida, alcalina e inicial, esta última corresponde ao pH em que a amostra apresentava no momento da coleta. A presença de tensoativos é confirmada neste teste já que agem na interface, de forma que quando sofrem aeração formam bolhas que estouram e aderem-se as paredes na vidraria utilizada. No final do processo, lavam-se as paredes da vidraria com

metanol, solvente comumente utilizado para se solubilizar este tipo de compostos e testes de toxicidade são realizados no metanol coletado. Os testes toxicológicos foram realizados nas amostras após serem aeradas por 1 hora. Foram testados brancos para avaliar possíveis contaminações. A figura 54 ilustra os valores de CE_{20} para os três rios.

Figura 54. Valores de CE_{20} em porcentagem das amostras dos três rios estudados.

Obs: As amostras foram submetidas a aeração e agitação magnética por 1 hora em seguida foram realizados testes de toxicidade na amostra após aeração. O protocolo utilizado consiste na diluição das amostras 9 vezes afim de calcular a CE_{20} , o resultado obtido foi confeccionado no gráfico juntamente com o valor de CE_{20} da amostra sem manipulação.

A aeração foi capaz de diminuir a toxicidade da amostra, indicando presença de compostos voláteis, ou tensoativos. Uma forma de complementar o ensaio de aeração é realizar uma lavagem com metanol na parede da vidraria utilizada.

Primeiramente, foi determinado a curva dose-resposta para o metanol usando o Sistema Microtox[®] (Figura 55), sendo que esta curva indica a concentração de metanol que não exerce efeito sobre o organismo, e a CE_{20} calculada foi de 5,04%.

Figura 55. Curva dose-resposta para o metanol puro obtida pelo sistema Microtox® em 15 minutos de exposição.

A concentração ideal em que o metanol não é tóxico para o organismo-teste corresponde a 4,0%, valor abaixo da CE_{20} do metanol. Nesta concentração espera-se que apenas o soluto possa exercer efeito tóxico no organismo. Desta forma, preparou-se uma solução de fenol em metanol na concentração de 4% e fenol na concentração de $47,5 \text{ mg L}^{-1}$. A CE_{20} calculada foi de 28,32%. O resultado toxicológico obtido deste experimento encontra-se ilustrado na figura 56.

Figura 56. Teste toxicológico para a solução de fenol em metanol na concentração de 47,5 mg L⁻¹. A CE₂₀ calculada é de 28,32% com intervalo de confiança de 25,94-30,91.

Juntamente com a solução de fenol, conduziu-se o mesmo teste com uma solução de metanol na concentração de 4%. Os resultados obtidos estão organizados na tabela 18:

Tabela 18. Resultado dos valores de toxicidade, efeito tóxico, no tempo de exposição de 5 e 15 minutos. Utilizando o protocolo com uma serie de nove diluições visando determinar a CE₂₀.

Concentração (%)	Efeito (%) em 5 minutos	Efeito (%) em 15 minutos
0,3199	-1,943	-2,07
0,6398	-1,250	-2,981
1,280	1,842	1,509
2,559	-2,307	-8,899
5,119	0,2191	-0,3898
10,24	-0,3712	-4,053
20,48	-4,364	-12,76
40,95	-7,144	-14,44
81,90	2,191	-4,315

Os valores de efeito, tanto em 5 minutos quanto em 15 minutos, foram negativos, indicando que a solução de metanol em água na concentração de 4% não é tóxico para o

sistema Microtox[®], logo esta série de experimentos indica que os valores de efeito representado na figura 56 são do soluto (fenol) apenas, e o metanol presente não exerce efeito tóxico no organismo-teste.

Os resultados obtidos em termos de CE₂₀ para o metanol recolhido da lavagem da vidraria estão apresentados na tabela 19:

Tabela 19. Resultados de toxicidade (CE₂₀ em 15 minutos) do metanol de lavagem usado após o procedimento de aeração.

Rios	CE ₂₀ (%)	Intervalo de Confiança (%)	Porcentagem de efeito na concentração de 81,9% (%)
Pinheiros	48,96	43,75-54,80	34,22
Tamanduateí	28,11	24,40-32,38	33,44
Tietê	71,95	‡	24,85

‡Não foi possível calcular o intervalo de confiança.

Os resultados apresentados na tabela 19 indicam que há espécies solubilizadas no metanol que estão causando toxicidade. Estas espécies, como dito anteriormente, são tensoativos que se aderem na vidraria. Os valores encontrados foram muito diferentes nos três rios estudados, embora sejam rios muito impactados. Aparentemente, o rio Tamanduateí apresentou uma maior toxicidade devido a tensoativos, que os demais rios estudados.

O teste de aeração deu informações importantes com relação ao grupo de compostos tóxicos. O teste foi capaz de diminuir a toxicidade da amostra e indicou a presença de tensoativos como um dos possíveis compostos tóxicos. Uma outra informação que pode ser descartada são os compostos voláteis pela aeração. Observa-se na figura 57, que muito da toxicidade é devido a compostos voláteis e uma pequena fração por tensoativos, com exceção do rio Tamanduateí que apresentou uma diminuição mais significativa por tensoativo. Os valores foram convertidos em Unidade Tóxica (UT) que corresponde ao inverso da CE₂₀ em porcentagem, a unidade tóxica facilita a visualização dos valores, pois estabelece uma relação de proporcionalidade.

Figura 57. Resultados de toxicidade apresentados anteriormente, porém convertidos em unidades tóxica, UT_{20} .

Obs: Aqui foram organizados de forma que possa se ver o quanto se recuperou da toxicidade pelas frações recolhidas, no caso, o metanol de lavagem e a aeração.

5.3.7 Recuperação da toxicidade a partir do eluato

Os procedimentos descritos na fase 1 foram realizados e os resultados obtidos sugerem que compostos orgânicos, material suspenso e espécies reativas ao tiossulfato de sódio são os principais responsáveis pela toxicidade da amostra nos três rios. As frações coletadas após a eluição do cartucho contêm informações importantes sobre a natureza do agente tóxico. Com isso, foram realizadas análises toxicológicas nas frações coletadas na extração em fase sólida, mais especificamente na C18. Nesta etapa, houve necessidade de realizar algumas manipulações no eluato, porque os solventes usados na extração (hexano, diclorometano) são muito tóxicos para o organismo-teste. Neste sentido, evaporou-se os solventes em um concentrador e em alguns casos usando um fluxo constante de nitrogênio, em seguida, solubilizou-se o extrato em metanol. Os extratos se foram solúveis em metanol e o teste de toxicidade foi conduzido da mesma forma que o utilizado para o metanol de lavagem.

Diluiu-se o eluato, concentrado 200 vezes após a extração, na proporção de 4:5. Esta diluição deixa o metanol, solvente presente no eluato, na concentração limite de 4%, entretanto o ideal seria diluir 200 vezes para que se tenha a mesma concentração antes e

depois da extração, logo se espera que os valores de CE₂₀ sejam mais baixos. Os resultados encontrados para o rio Pinheiros encontram-se na tabela 20:

Tabela 20. Resultados de CE₂₀ (%) em 15 minutos de exposição para o rio Pinheiros o valor do intervalo de confiança (IC) e o efeito em porcentagem na concentração máxima de 81,9%.

Tipo de cartucho usado	Solvente	pH	CE ₂₀ (%)	IC (%)	Efeito na concentração máxima de 81,9%
C18	Hexano	Inicial	4,147	3,389-5,074	92,54%
C18	DCM/Hexano	Inicial	51,35	45,67-57,74	45,68%
C18	Metanol/DCM	Inicial	-	-	15,27%
C18	Hexano	Inicial	-	-	-0,1196%
C18	DCM/Hexano	Inicial	32,69	22,51-47,46	49,09%
C18	Metanol/DCM	Inicial	-	-	5,047%
HLB	Metanol	Ácido	26,60	22,59-31,32	46,89%
HLB	Metanol	Ácido	29,60	16,51-53,05	34,80%
HLB	Metanol	Básico	6,262	4,760-8,237	66,88%
HLB	Metanol/Ac. Fórmico	Básico	-	-	28,08%

(DCM) diclorometano; (-) não foi possível calcular a CE₂₀ devido toxicidade baixa do composto.

Apenas os eluatos obtidos da extração em fase sólida que foram armazenados por maior período de tempo, por estarem em solventes orgânicos e em baixa temperatura, apresentam uma maior estabilidade química.

As frações recolhidas na extração em fase sólida apresentaram toxicidade com ênfase nas frações diclorometano/hexano e hexano que apresentaram toxicidade em pH inicial usando o cartucho tipo C18. Em outros pH, as frações em metanol apresentaram maior toxicidade. Os solventes utilizados na extração, hexano e diclorometano, podem confirmar a polaridade dos compostos presentes, sendo que as frações que apresentaram toxicidade são as mais apolares. Castillo e Barceló (1999) indicam os tensoativos como principais compostos eluídos por estes solventes, e especificam os AEO (*Alcohol polyethoxylates*), os NPEO (*nonylphenol polyethoxylates*) nestas frações. Entretanto, é difícil confirmar a presença destes compostos na amostra do rio Pinheiros sem análise química desta fração extraída.

A toxicidade CE₅₀ destes tensoativos para a bactéria *A. fischeri* é entorno de 1,5 a 11,4 mg L⁻¹ em 5 minutos de exposição (DORN et al., 1993). Tratam-se de substâncias muito tóxicas para este organismo-teste. Existem estudos que avaliam o risco da exposição destas tensoativos para a saúde humana (HERA, 2009).

Os dados apresentados na tabela 20 foram convertidos para os valores de unidade tóxica e a fim de verificar a contribuição de cada fração e das outras manipulações na toxicidade total, construiu-se a figura 58:

Figura 58. Resultados médios expressos em termos de unidade tóxica (UT_{20}) em 15 minutos de exposição para o rio Pinheiros.

Obs: Somente as manipulações que reduziram a toxicidade da amostra do rio Pinheiros foram consideradas.

Na figura 58 pode-se observar os valores médios de unidade tóxica para o rio Pinheiros. Ao somar os valores de UT_{20} , vê-se que os valores totalizam o valor inicial da toxicidade, o modelo usado supõe interações aditivas entre os compostos, entretanto existem outros tipos de modelo de interação entre os xenobióticos, sinergismo, potenciação e antagonismo (OGA, CAMARGO e BATISTUZZO, 2008). Mesmo adotando o modelo aditivo, os resultados apresentados são satisfatórios. No pH neutro, os resultados das manipulações são maiores que o valor da toxicidade inicial do rio, muito embora tenham-se extraído todos os compostos tóxicos da amostra conforme ilustrado na figura 52b.

De forma geral, todas as manipulações feitas nas águas do rio Pinheiros: filtração, aeração, extração em fase sólida (A80 e A170), os eluatos foram reunidas em duas figuras. Não foi possível colocar os valores de EDTA e tiossulfato pois pelo método utilizado para o teste de toxicidade, protocolo de dose-única na concentração de 81,9%, não se obtêm o CE_{20} , mas sim o efeito (%) para aquela concentração testada (figuras 59).

Figura 59. Resumo com os valores de CE₂₀ em porcentagem de todas as manipulações realizadas na amostra do rio Pinheiros, filtração aeração, extração em fase sólida, eluatos nas três faixas de pH trabalhadas.

Os resultados de toxicidade dos eluatos do rio Tamanduateí em todas as faixas de pH e solventes utilizados estão organizados na tabela 21:

Tabela 21. Resultados de CE₂₀ (%) em 15 minutos de exposição para o rio Tamanduateí o valor do intervalo de confiança (IC) e o efeito em porcentagem na concentração máxima de 81,9%.

Tipo de Coluna usada	Solvente	pH	CE ₂₀	IC (%)	Efeito na concentração máxima de 81,9%
C18	Hexano	Inicial	34,22%	19,80-59,14	50,03%
C18	DCM/Hexano	Inicial	14,62%	13,60-15,72	56,60%
C18	Metanol/DCM	Inicial	-	-	2,911%
C18	Hexano	Inicial	-	-	-13,45%
C18	DCM/Hexano	Inicial	39,73%	29,46-53,58	39,35%
C18	Metanol/DCM	Inicial	-	-	10,16%
HLB	Metanol	Básico	2,769%	2,216-3,460	70,13%
HLB	Metanol	Ácido	10,05%	7,556-13,35	58,56%
HLB	Metanol	Ácido	-	-	13,56%

(DCM) diclorometano; (-) não foi possível calcular a CE₂₀ devido toxicidade baixa do composto.

Assim como no rio Pinheiros, o rio Tamanduateí apresentou toxicidade nas frações mais apolares, hexano e diclorometano/hexano em pH inicial. Em pH ácido e básico as frações ricas em substâncias tóxicas são aquelas eluídas em metanol. Os resultados em unidades tóxicas somando os valores de UT₂₀ de cada manipulação realizada para o rio Tamanduateí estão apresentados na figura 61.

Figura 60. Resultados médios expressos em termos de unidade tóxica (UT₂₀) em 15 minutos de exposição para o rio Tamanduateí.

As somas dos valores de unidade tóxica estão bem próximas do valor original da toxicidade do rio, indicando um forte indício de que o a toxicidade foi recuperada plenamente. Entretanto, em pH alcalinos a somatória foi muito maior do que o observado. Este fato é de

difícil explicação, uma vez que não se tem conhecimento das substâncias presentes e metabólitos do analito, ou até um produto de degradação pode ter gerado tal efeito, ou o modelo escolhido de interação entre os xenobióticos não corresponde à verdadeira natureza da amostra.

Gráficos com todos os valores de CE₂₀ referentes ao rio Tamanduateí em todas as faixas de pH testados estão apresentados na figura 6. Os dados são de duas amostras distintas do rio Tamanduateí.

Figura 61. Resumo com os valores de CE₂₀ em porcentagem de todas as manipulações realizadas na amostra do rio Tamanduateí, filtração aeração, extração em fase sólida, eluatos nas três faixas de pH.

Na tabela 22 estão organizados os resultados para o valor de toxicidade dos eluatos do Rio Tietê.

Tabela 22. Resultados de CE₂₀ (%) em 15 minutos de exposição para o rio Tietê o valor do intervalo de confiança (IC) e o efeito em porcentagem na concentração máxima de 81,9%.

Tipo de Coluna usada	Solvente	pH	CE20	IC (%)	Efeito na concentração máxima de 81,9%
C18	Hexano	Inicial	-	-	0,8653%
C18	DCM/Hexano	Inicial	39,77%	36,42-43,42	42,45%
C18	Metanol/DCM	Inicial	21,43%	17,29-26,57	46,00%
C18	Hexano	Inicial	-	-	-12,40%
C18	DCM/Hexano	Inicial	68,88%	27,99-169,5	27,50%
C18	Metanol/DCM	Inicial	-	-	10,49%
HLB	Metanol	Básico	10,97%	9,757-12,34	61,11%
HLB	Metanol/Ac. Fórmico	Básico	-	-	26,50%
HLB	Metanol	Ácido	40,82%	24,9-66,92	33,76%
HLB	Metanol	Ácido	-	-	5,824%

(DCM) diclorometano; (-) não foi possível calcular a CE₂₀ devido toxicidade baixa do composto.

A fração polar e com polaridade intermediária foram as que apresentaram maior toxicidade para o rio Tietê em pH inicial. Nas faixas de pH restantes a fração em metanol apresentou maior toxicidade. Como mencionado anteriormente, estas frações, principalmente a diclorometano/hexano, podem indicar a presença de tensoativos polietoxilados funcionalizados com álcoois ou fenóis. Para uma melhor elucidação e identificação dos compostos tóxicos do analito é necessário realizar análises químicas, porém o método aqui empregado indica a classe de compostos que estes agentes tóxicos pertencem e desta forma pode-se sugerir a melhor instrumentação analítica para se determinar o composto com precisão. Por se tratar de compostos com uma grande cadeia hidrofóbica indicam-se análises mais robustas como espectrômetros de massas do tipo *in tandem* acoplados à cromatografia líquida de alta eficiência.

Os dados de unidade tóxica para as frações recolhidas na extração em fase sólida estão apresentados na figura 62.

Figura 62. Resultados médios expressos em termos de unidade tóxica (UT_{20}) em 15 minutos de exposição. Somente as manipulações que reduziram a toxicidade da amostra do rio Tietê foram colocadas.

Os resultados apresentados na figura acima indicam que toda a toxicidade do rio Tietê está nas frações obtidas, ou seja, o somatório das unidades tóxicas corresponde à toxicidade inicial da amostra sem sofrer nenhuma manipulação e este comportamento é visto independente do pH. Nesta figura pode-se ver a contribuição da filtração na toxicidade que corresponde a quase 50% do total para o rio Tietê. Os resultados apresentados das manipulações realizadas neste trabalho foram reunidos em duas, figuras 63, que resumem os resultados obtidos para o rio Tietê.

Figura 63. Resumo com os valores de CE₂₀ em porcentagem de todas as manipulações realizadas na amostra do rio Tietê, filtração aeração, extração em fase sólida, eluatos nas três faixas de pH.

6 CONCLUSÕES

A avaliação e identificação da toxicidade são métodos que preconizam o fracionamento da amostra, valendo-se das propriedades físico-químicas do analito para identifica-lo. Rios como o Tietê, Tamanduateí e Pinheiros tiveram sua importância histórica, mas atualmente sofrem com os efeitos da poluição causados pelo desenvolvimento industrial e com o aumento da densidade demográfica. Mesmo com políticas públicas e fiscalização o efeito da poluição ainda é visível na cidade de São Paulo, com elevados índices de toxicidade. Neste contexto faz-se necessário entender o tipo de poluição destes rios e assim criar métodos mais eficazes de análise química, bem como, políticas públicas para o lançamento de esgoto doméstico e efluente industriais de forma a coibir a poluição em todo o estado de São Paulo.

- Neste trabalho verificou-se que a toxicidade destes rios, detectadas pela *Aliivibrio fischeri*, é originária de uma mistura de compostos, dentre eles destacam-se os compostos orgânicos, apolares e voláteis, tensoativos não iônicos e os materiais suspensos na amostra.
- A manipulação com EDTA não teve efeito sobre a toxicidade das amostras, entretanto observou-se uma pequena diminuição da toxicidade ao se empregar tiosulfato de sódio, que é um agente redutor e reage principalmente com halogênios e outros metais.
- A filtração a vácuo também reduziu a toxicidade da amostra, e a mudança no pH não afetou o desempenho, em termos de toxicidade. O rio Tamanduateí por sua vez teve um comportamento diferente dos demais na filtração, apenas a filtração em pH ácido reduziu a toxicidade, nas demais faixas de pH a redução da toxicidade não foi estatisticamente significativa. A redução da toxicidade atribuída pela filtração é oriunda das partículas suspensas na amostra que são materiais de origem incerta, já que os rios estudados são muito impactados pelo lançamento de esgoto e da própria poluição atmosférica.
- Os compostos orgânicos apolares foram identificados pela extração em fase sólida que foi a única das manipulações capaz de reduzir totalmente a toxicidade das amostras. Utilizou-se dois tipos de cartuchos, Oasis[®] HLB e C18, que possuem características distintas polar e apolar.
- A aeração indicou a presença de compostos orgânicos voláteis pela diminuição da toxicidade. Testes toxicológicos no metanol de lavagem confirmaram os tensoativos

como uma das classes de compostos tóxicos presentes nos rios Tietê, Pinheiros e Tamanduateí.

- A eluição dos cartuchos C18 e HLB e a toxicidade das frações podem informar algumas características químicas dos compostos tóxicos presentes, principalmente dos cartuchos C18, onde foi realizado um fracionamento mais detalhado. As frações em hexano e diclorometano/hexano foram as que apresentaram maior toxicidade com relação ao soluto solubilizado, logo espera-se que nestas frações estejam compostos mais apolares. O método usado na eluição dos cartuchos é utilizado na extração de tensoativos e nesta faixa de polaridade os tensoativos não iônicos são mais detectados, entretanto para identificar e confirmar os compostos mais precisamente, testes químicos devem ser realizados associados com os testes toxicológicos.
- A somatória da toxicidade dos eluatos e da CE_{20} obtida da filtração é muito próxima da toxicidade inicial do rio sem manipulação, porém em pH inicial, o rio Pinheiros, e em pH alcalino, o rio Tamanduateí, o modelo aditivo não mostrou ser o mais indicado. Fica como sugestão, modelos de interação entre os agentes tóxicos como antagonismo, ou sinergismo.
- O método para avaliação e identificação da toxicidade da amostra proposto pela USEPA em 1991 ainda mostrou ser relevante. As alterações na metodologia feitas para adequar ao organismo-teste, *Aliivibrio fischeri*, não comprometeram os resultados. A modernização das metodologias ainda se faz necessária principalmente nas manipulações relacionadas a determinar a presença de metais. Atualmente há uma infinidade de materiais capazes de remover metais de diversos grupos, bem como para o tiosulfato de sódio, a eletroquímica avançou muito e é possível determinar espécies com atividade redox mais facilmente e com mais precisão.
- A metodologia de extração em fase sólida proposta neste trabalho mostrou a capacidade de remoção total da toxicidade de rios muito impactados do Estado de São Paulo para o organismo-teste estudado e isto reflete diretamente no tipo de poluição presente.

7 RECOMENDAÇÕES

Em função dos resultados obtidos, cabe agora o melhor entendimento da dinâmica dos compostos orgânicos apolares e voláteis nos rios estudados para assim, dar início a uma evolução na diminuição da toxicidade, visando a recuperação da integridade destes corpos hídricos. Além disso, deve-se estimular um tratamento de esgoto doméstico mais eficiente que seja capaz de remover um número maior de substâncias, em especial os tensoativos, e a conscientização por meio da educação ambiental da população com relação ao uso de produtos biodegradáveis. Cabe a todos os setores da sociedade e aos políticos concentrarem esforços em ações que visem a despoluição dos rios, pois o benefício que estes podem trazer para a cidade justificará todo o esforço despendido.

REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 15411-1**: Ecotoxicologia aquática - Determinação do efeito inibitório de amostra aquosa sobre a emissão de luz de *Vibrio fischeri* (ensaio luminescente) Parte 3: Método utilizando bactérias liofilizadas. Rio de Janeiro, 23 p. 2012.

ADEME, A. **Sistema de análise em fluxo empregando multicomutação para avaliação de toxicidade aguda com *Vibrio fischeri***. 2014. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciências: Química na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo. Piracicaba. 2014.

ANDRADE-EIROA, A.; CANLE, M.; LEROY-CANCELLIERI, V.; CERDÀ V. Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review (Part I). **Trends in Analytical Chemistry**, 2016. No prelo.

ARBEX, M. A.; SANTOS, U. P.; MARTINS, L. C.; SALDIVA, P. H. N.; PEREIRA, L. A. A.; BRAGA, A. L. F. A poluição do ar e o sistema respiratório. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, São Paulo, v. 38, n. 5, p. 643-655, 2012.

ARQUIVO/AE. Em 2015, rio Tietê terá vida aquática. **Band**, São Paulo, 2011. Disponível em: <<http://noticias.band.uol.com.br/cidades/noticia/?id=100000457814>>. Acesso em: 20 jun. 2016.

BARRETO, J. C. N. **Caracterização de toxicidade de efluentes de usina siderúrgica mediante bioensaios com microorganismos**. 1995. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciências: Saúde Ambiental) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo. São Paulo, 1995.

BIBLIOTECA VIRTUAL. **São Paulo**: hidrografia. São Paulo, 2016. Disponível em: <<http://www.bibliotecavirtual.sp.gov.br/temas/sao-paulo/sao-paulo-hidrografia.php>>. Acesso em: 23 jun. 2016.

BOUDOU, A.; RIBEYRE, F. Fundamentals concepts in aquatic ecotoxicology. In: _____. **Aquatic Ecotoxicology: fundamental concepts and methodologies**. [S.l.]: Boca Raton: CRC Press, v. 1, 1989. Cap. 1, p. 35-74.

BRASIL. Ministério de Meio Ambiente. Secretaria de Recursos Hídricos. **Água: Manual de uso Vamos cuidar de nossas água alguns passos na implementação do plano nacional de recursos hídricos**. Brasília, 2006. 112 p.

_____. Ministério de Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA. RESOLUÇÃO nº 357. Brasília, 2005.

BURATINI, S. V. **Avaliação e identificação da Toxicidade de efluentes e amostras ambientais líquidas**. São Paulo: CETESB, 2011.

_____. **Avaliação e Identificação da Toxicidade no Rio Baquirivu-Guaçu**. São Paulo: CETESB, 2005. 21 p. Relatório técnico.

BURATINI, S. V.; ARAGÃO, M. A. **Avaliação e Identificação da Toxicidade Crônica no Canal de Fuga II (Ponto CFUG02900)**. São Paulo: CETESB, 2007. 18 p. Relatório técnico.

CAMPOS, A. P. S. **A presença de metais e compostos químicos orgânicos nas águas superficiais e nos sedimentos do Rio Tietê**. 2012. 323 f. Tese (Doutorado em Ciências: Saúde Ambiental) - Faculdade de Saúde Publica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

CASTILLO, M.; BARCELÓ, D. Identification of Polar Toxicants in Industrial Wastewaters using Toxicity-Based Fractionation with Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, Barcelona, v. 71, n. 17, p. 3769-3776, 1999.

CETESB - COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Toxicidade e genotoxicidade de água intersticial proveniente de sedimento na Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos do Alto Tietê (UGRHI 6): relatório técnico**. São Paulo, 2017. 38 p. Disponível em: <<http://cetesb.sp.gov.br/wp->

content/uploads/2018/02/Toxicidade-e-genotoxicidade-de-água-intersticial-de-sedimento-no-Alto-Tietê-UGRHI-6.pdf>. Acesso em: 10 jun. 2018.

_____. **Qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo**: relatório técnico. São Paulo: CETESB, 2016. 282 p.

_____. **Qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo**: relatório técnico. São Paulo: CETESB, 2014. 376 p.

_____. **Qualidade das águas superficiais no Estado de São Paulo**: relatório técnico. São Paulo: CETESB, 2013. 434 p.

CUNHA, V. Rio Tietê, o renascido. **National Geographic Brasil**, 2010. Disponível em: <<http://viajeaqui.abril.com.br/materias/rio-tiete-poluicao>>. Acesso em: 20 jun. 2016.

DIGIULIO, R. T.; NEWMAN, M. C. Ecotoxicologia. In: KLAASSEN, C. D.; , J. B. W. **Fundamentos em Toxicologia de Casarett e Doull**. 2a ed. Porto Alegre: AMGH Editora, 2012. Cap. 29, 474 p.

DONASCI, F. Cotidiano. **Folha de São Paulo**, 2015. Disponível em: <<http://www1.folha.uol.com.br/cotidiano/2015/07/1653563-sp-busca-parceria-privada-em-novo-plano-para-despoluir-o-rio-pinheiros.shtml>>. Acesso em: 23 jun. 2016.

DORN, P. B.; SALANITRO, J. P.; EVANS, S. H.; KRAVETZ, L. **Assessing the aquatic hazard of some branched and linear nonionic surfactants by biodegradation and toxicity**. Environmental Toxicology and Chemistry, [S.I.], v. 12, n. 10, p.1751-1762, 1993.

FABHAT - Fundação Agência da Bacia Hidrográfica do Alto Tietê. **Relatório de Situação dos Recursos Hídricos**. São Paulo, p.174. 2011. Disponível em: <<http://www.fabhat.org.br/site/images/docs/Rel.Sit.2011.AT.pdf>> Acesso em: 22 jun. 2015

FARRÉ, M. L.; GARCIA, M.J.; TIRAPU, L.; GINEBRED A.; BARCELÓ D. Wastewater toxicity screening of non-ionic surfactants by Toxialert® and Microtox® bioluminescence inhibition assays. **Analytica Chimica Acta** , v. 427, p. 181-189, 2001.

FÁVERO, L. P. **Manual de análise de dados:** Estatística e Modelagem Multivariada com Excel, SPSS e Stata. 1a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2017.

FERNICOLA, N. A. G. G. D.; BOHRER-MOREL, M. B. C.; BAINY, A. C. D. Ecotoxicologia. In: AZEVEDO, F. A. D.; CHASIN, A. A. D. M. **As Bases Toxicológicas da Ecotoxicologia**. 2a ed. São Paulo: RiMa Editora, 2003. Cap. 7, 225 p.

GOODFELLOW, W. L.; BRILS, J.; BURGESS, R. M.; DOI, J.; DOWNEY, P. J.; MATTHEWS, D. L.; NORBERG-KING, T. J.; PHILLIPS, B. M. Toxicity reduction and Toxicity Identification Evaluations for Effluents, Ambient waters, and other aqueous media. Pensacola: SETAC, 2005. p. 59-92,

GOUVEIA, I. C. M. C. **Da originalidade do sítio urbano de São paulo às formas antrópicas: aplicação da abordagem da Geomorfologia Antropogênica na Bacia Hidrográfica do Rio Tamanduateí, na Região Metropolitana de São Paulo**. 2010. 385 f. Tese (Doutorado em Geografia Física) - Faculdade de Filosofia, Letras e Ciências Humanas, Departamento de Geografia, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2010.

GUZZELLA, L.; BARTONE C.; ROSS P.; TARTARI G.; MUNTAU H. Toxicity Identification Evaluation of Lake Orta (Northern Italy) Sediments Using the Microtox System. **Ecotoxicology and Environmental**, [SI], v. 35, n. 104, p. 231-235, 1996.

HACON, S. D. S. Avaliação e Gestão do Risco Ecotoxicológico à Saúde Humana. In: AZEVEDO, F. A. D.; CHASIN, A. A. D. M. **As Bases Toxicológicas da Ecotoxicologia**. 2a ed. São Paulo: RiMa, 2004. Cap. 8, 245 p.

HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. 8a ed. Rio de Janeiro: LTC, 2013.

HERA - HUMAN & ENVIRONMENTAL RISK ASSESSMENT ON INGREDIENTS OF EUROPEAN HOUSEHOLD CLEANING PRODUCTS (Org). **Alcohol Ethoxylates**. 2. ed. [S.I.], 2009. 244 p.

HEWITT, L. M.; MARVIN, C. H. Analytical methods in environmental effects-directed investigations of effluents. **Mutation Research**, v. 589, p. 208-232, 2005.

HLAVAY, J.; POLYÁK, K. Sample Preparation: Fractionation (Sediments, Soils, Aerosols, and Fly Ashes). In: CORNELIS, R.; CARUSO, J.; CREWES, H.; HEUMANN, K. **Handbook of Elemental Speciation: Techniques and Methodology**. Chichester, Inglaterra: Wiley, 2005. Cap 3.3. p. 119-144.

HODGSON, E. Introduction to Toxicology. In: _____. **A Textbook of Modern Toxicology**. 4a ed. [S.I.]: John Wiley & Sons, 2010. Cap. 1, p. 3-13.

HWANG, H.; ALEGRE, G. F.; BORRELY, S. I.; FLYNN, M. N. Avaliação de toxicidade em sedimento do rio Juqueri (SP) com *Vibrio fischeri* e *Hyalella azteca*. **Intertox de Toxicologia, Riscos Ambientais e Sociedade**, São Paulo, v. 2, n. 2, p. 18-28, 2009.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Estimativas de população 2015**, 2015. Disponível em: <ftp://ftp.ibge.gov.br/Estimativas_de_Populacao/Estimativas_2015/estimativa_dou_2015_20150915.pdf>. Acesso em: 20 jun. 2016.

INOUE, S. NAD(P)H-flavin oxidoreductase from the bioluminescent bacterium, *Vibrio fischeri* ATCC 7744, is flavoprotein. **FEBS Letters**, [S.I.], v. 347 ,p. 163-168, 1994.

KNIE, J. L. W.; LOPES, E. W. B. **Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações**. Florianópolis: FATMA/GTZ, 2004. 289 p.

KRUG, F. J. **Métodos de preparo de amostras**; fundamentos sobre preparo de amostras orgânica e inorgânicas para análise elementar. 1a ed. Piracicaba: [s.n.], 2008.

LEUSCH, F.; CHAPMAN, H.; TAYLOR, R.; MOORE, M.; AKEROYD, M.; FALCONER I. R. The role of toxicity substances: A framework for identification of suspected toxic compounds in water. **Department of Health and Human Services**, 2012. Disponível em: <<http://www.dhhs.tas.gov.au>>. Acesso em: 03 fev. 2015.

LUZ, R. A. **Mudanças geomorfológicas na planície fluvial do Rio Pinheiros, São Paulo (SP), ao longo do processo de urbanização**. 2015. Tese (Doutorado em Geografia Física) - Faculdade de Filosofia, Letras e Ciências Humanas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

MANAHAN, S. E. **Química ambiental**. 9ª. ed. Porto Alegre: Bookman, 2013.

MAXXAM. Toxicity Identification Evaluation. [Burnaby]. 2010. Disponível em: <maxxam.ca>. Acesso em: 4 fev. 2015.

MELO, E. D. D. **Avaliação e identificação da toxicidade de efluentes líquidos de uma indústria de cosméticos**. 2012. 115 f. Dissertação (Mestrado em Ciências: Engenharia Civil) Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2012.

MODERN Water Microtox. Schaumburg: JJS Technical Services, 2016. Disponível em: <<https://www.jjstech.com/azf50a000-azf50a002.html>> Acesso em: 02 out 2016

NETO, A. C. N. **Avaliação de toxicidade aguda e crônica em água do rio Jundiaí e em afuentes e efluentes da ETE Novo Horizonte, Jundiaí, São Paulo**. 2009. 75 f. Dissertação (Mestrado em Ciência: Tecnologia Nuclear)- Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares, autarquia associada à Universidade de São Paulo. São Paulo, 2009.

ONU - ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS. **The right to water**, 2010. Disponível em: <<http://www.un.org/en/sections/issues-depth/water/index.html>>. Acesso em: 21 jun. 2016.

OGA, S.; CAMARGO, M. M. D. A.; BATISTUZZO, J. A. D. O. **Fundamentos de Toxicologia**. 3a ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2008.

PAGANINI, W. D. S. **A identidade de um rio de contrastes: o Tietê e seus múltiplos usos.** 2a ed. São Paulo: Aesabesp, 2008.

PÉREZ-CID, B.; LAVILLA, I.; BENDICHO, C. Analytical Assessment of Two Sequential Extraction Schemes for Metal Partitioning in Sewage Sludges. **Analyst**, v. 121, p. 1479-1484, 1996.

POLEZA, F.; SOUZA, R. C.; STRAMOSK, C. A.; RORIG, L. R.; JUNIOR, C. R. Avaliação de toxicidade aguda para o organismos-tste *Vibrio fischeri* dos principais herbicidas e inseticidas aplicados na lavoura de arroz irrigado dos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 18, p. 107-114, 2008.

POTTS, P. J.; ROBINSON, P. Sample preparation of geological samples, soils and sediments. In: MESTER, Z.; STURGEON, R. **Sample Preparation of Trace Element Analysis**. Amsterdam: Elsevier, 2003. Cap. 24, p. 723-763.

RAMALHO, D. Rio Tamanduateí - Nascente à Foz: Percepções da Paisagem e Processos Participativos. **Paisagem Ambiente: ensaios**, São Paulo, n. 24, p. 99-114, 2007.

RAND, G. M. Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate and Risk Assessment. In: RAND, G. M.; WELL, P. G.; MCCARTY, L. S. **Introduction to Aquatic Toxicology**. 2a ed. Washington: Taylor & Francis, 1995. p. 3-67.

RIO Pinheiros - Sua História e Perspectivas. Direção de Diana Zatz Mussi. 2015. (13 min.), color. Disponível em: <<https://www.youtube.com/watch?v=0ZDfLI2BuW4&t=2s>>. Acesso em: 25 ago. 2016.

RODRIGUES, F. M. G. **Análise da evolução das transformações no rio Pinheiros e das políticas ambientais associadas, São Paulo - SP.** 2012. Dissertação (Mestrado em Geografia Física) - Faculdade de Filosofia, Letras e Ciências Humanas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

SABESP - COMPANHIA DE SANEAMENTO BÁSICO DO ESTADO DE SÃO PAULO.

Sabesp realiza visita à nascente do Rio Tietê. SABESP, 2011. Disponível em:

<<http://site.sabesp.com.br/site/imprensa/noticias-detalle.aspx?secaoId=65&id=3080>>. Acesso em: 20 jun. 2016.

SAHUQUILLO, A.; RIGOL, A.; RAURET, G. Overview of the use of leaching/extraction tests for risk assessment of trace metals in contaminated soils and sediments. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 3, p. 152-159, 2003.

SCHIAVONI, E. Espuma de poluição do rio Tietê invade ruas de Pirapora do Bom Jesus (SP). **UOL Notícias**, 23 Julho 2015. Disponível em:

<<http://noticias.uol.com.br/cotidiano/ultimas-noticias/2015/06/23/espuma-de-poluicao-do-tiete-invade-ruas-de-pirapora-do-bom-jesus-sp.htm#fotoNav=30>>. Acesso em: 14 jun. 2016.

SHIKLOMANOV, I. A.; RODDA, J. C. **World Water Resources at the Beginning of the Twenty-First Century**. Universidade de Cambridge. Cambridge, 435 p. 2003.

SIGMA-ALDRICH. **Bulletin 910**: Guide to solid phase extraction. Boletim técnico. [S.I]: Sigma-Aldrich Co, 1998. 18 p.

SIGRH – SISTEMA INTEGRADO DE GERENCIAMENTO DE RECURSOS HÍDRICOS DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Comitê de Bacias Hidrográfica do Alto Tietê**. CBH-AT, 2018. Disponível em: <<http://www.sigrh.sp.gov.br/cbhat/apresentacao>> Acesso em: 18 mar. 2018.

SILVA, F. F. D. **Avaliação da Mobilidade de Arsênio, Cádmio, Cromo, Cobre, Níquel, Chumbo e Zinco nos Sedimentos da Basia do Rio Ribeira de Iguape**. 2014. 253 f. Tese (Doutorado em Ciências: Química) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

SOUZA, J. G. **Projeto para a Redução de Consumo de Água Potável em Residências de Belo Horizonte, A Partir do Aproveitamento de Água de Chuva e Reúso de Águas Cinzas**. 2010. 110 f. Trabalho de Conclusão de Pós-Graduação (Especialista em Construção Civil) –Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

TEMPLETON, D. M.; ARIESE, F.; CORNELIS, R.; DANIELSSON, L.; MUNTAU, H.; LEEUWEN H. P. V.; LOBIŃSKI R. Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definition, structural aspects, and methodological approaches. **Pure Applied Chemistry**, v. 72, n. 8, p. 1453-1470, 2000.

USEPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Method 1694: Pharmaceuticals and Personal Care Products in Water, Soil, Sediment and Biosolids by HPLC/MS/MS**. [S.I.]: USEPA, 2007.

_____. **Methods for Aquatic Toxicity Identification Evaluations: Phase I Toxicity Characterization Procedures**. [S.I.]: USEPA, 1991.

_____. **Methods for Aquatic Toxicity Identification Evaluations: Phase II Toxicity Identification Procedures**. [S.I.]: USEPA, 1989.

_____. **Methods for Aquatic Toxicity Identification Evaluations: Phase III Toxicity Confirmation Procedures for Samples Exhibiting Acute and Chronic Toxicity**. [S.I.]: USEPA, 1993.

VOGEL, A. I. **Química Analítica Qualitativa**. 5a ed. São Paulo: Mestre Jou, 1981.

WATERS CORPORATION. **Care and use manual: Oasis HLB Cartridges and 96-Well Plates**. [New York], 2014. Disponível em: <www.waters.com>. Acesso em: 05 nov. 2016.

WHITAKER, P. Espuma de poluição do rio Tietê invade ruas de Pirapora do Bom Jesus (SP). **Uol Notícias**, Pirapora do Bom Jesus, 2015. Disponível em: <<http://noticias.uol.com.br/cotidiano/ultimas-noticias/2015/06/23/espuma-de-poluicao-do-tiete-invade-ruas-de-pirapora-do-bom-jesus-sp.htm#fotoNav=30>>. Acesso em: 14 jun. 2016.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals.**Report**. Geneva, 2012. 289 p.

YU, H. T. M. T. M.**Environmental Toxicology**: Biological and Health Effects of Pollutants. 3a ed. [S.l.]: CRC Press, 2011.

ANEXOS

ANEXO A - Tabelas

Tabela 23. Parâmetros físico-químicos de campo, compostos orgânicos voláteis, ecotoxicológicos e químicos referente ao ano de 2016 do rio Tietê.

Descrição do parâmetro	Und.	13/01	09/03	10/05	20/07	29/09	24/11
Chuvas nas últimas 24 h	-	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Sim
Coloração	-	Marrom	Marrom	Preta	Preta	Preta	Cinza
Condutividade	$\mu\text{S cm}^{-1}$	452	412	891	691	869	611
Oxigênio Dissolvido	mg L^{-1}	1,63	0,94	0,39	0,81	0,44	0,71
pH	-	7,05	6,92	7,15	6,96	7,25	7,22
Temperatura da Água	$^{\circ}\text{C}$	24,62	24,51	22,13	16,97	22,7	23,52
Temperatura do Ar	$^{\circ}\text{C}$	25	24,6	20,4	14	24,3	23,1
Vazão	$\text{m}^3 \text{s}^{-1}$		81,786		24,818	21,626	
Tipo de Parâmetros: Compostos Orgânicos Voláteis (COVs)							
Descrição do Parâmetro	Und.	13/01	09/03	10/05	20/07	29/09	24/11
Benzeno	$\mu\text{g L}^{-1}$	< 2,5		< 2,5	< 2,5		< 2,5
Estireno	$\mu\text{g L}^{-1}$	< 5		< 5	< 5		< 5
Etilbenzeno	$\mu\text{g L}^{-1}$	< 2,5		< 2,5	< 2,5		< 2,5
<i>m,p</i> ,-Xileno	$\mu\text{g L}^{-1}$	< 5		< 5	< 5		< 5
<i>o</i> -Xileno	$\mu\text{g L}^{-1}$	< 2,5		< 2,5	< 2,5		< 2,5
Tolueno	$\mu\text{g L}^{-1}$	< 2		41,6	8,44		21,6
Tipo de Parâmetro: Ecotoxicológicos							
Descrição do Parâmetro	Und.	13/01	09/03	10/05	20/07	29/09	24/11
Ens. Ecotoxic. c/ <i>A. fischeri</i>	$\text{CE}_{20}(\%)$	30,1	> 81,9	8,3	10,9	16,8	> 81,9
Tipo de Parâmetros: Físicos e Químicos							
Descrição do Parâmetro	Und.	13/01	09/03	10/05	20/07	29/09	24/11
Alumínio Dissolvido	mg L^{-1}	0,16	0,11	0,3	< 0,1	0,13	< 0,1
Alumínio Total	mg L^{-1}	1,51	1,1	1,3	2,23	1,2	1,25
Arsênio Total	mg L^{-1}	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01
Bário Total	mg L^{-1}	0,06	0,05	0,06	0,07	0,06	0,06
Cádmio Total	mg L^{-1}	< 0,0007	< 0,0007	< 0,0007	< 0,0007	< 0,0007	< 0,0007
Carbono Orgânico Total	mg L^{-1}	10,1	13,6	27,8	27,2	33,9	28,9
Chumbo Total	mg L^{-1}	< 0,009	< 0,009	< 0,009	< 0,009	< 0,009	< 0,009
Cloreto Total	mg L^{-1}	34,6	36,2	101	89,5	102	57,4
Cobre Dissolvido	mg L^{-1}	< 0,009	< 0,009	0,01	0,02	0,02	< 0,009
Cobre Total	mg L^{-1}	0,02	< 0,01	0,04	0,11	0,07	0,04
Cromo Total	mg L^{-1}	< 0,02	< 0,02	0,04	0,06	0,08	< 0,02

Continua na página seguinte

DBO (5, 20)	mg L ⁻¹	17	16	83	< 3	71	56
Fenóis Totais	mg L ⁻¹	< 0,003	0,006	0,04	0,04	0,04	< 0,003
Ferro Dissolvido	mg L ⁻¹	0,43	0,39	0,64	0,82	0,55	0,98
Ferro Total	mg L ⁻¹	1,81	1,56	2,21	2,66	1,58	2,27
Fósforo Total	mg L ⁻¹	0,4	0,49	2,54	2,43	2,55	1,32
Manganês Total	mg L ⁻¹	0,21	0,18	0,2	0,19	0,18	0,21
Mercúrio Total	mg L ⁻¹	< 0,0002	< 0,0002	< 0,0002	< 0,0002	< 0,0002	< 0,0002
Níquel Total	mg L ⁻¹	0,02	0,05	0,05	0,04	0,05	0,09
Nitrogênio Amoniacal	mg L ⁻¹	5,8	5,22	23,6	20,3	23,2	13,6
Nitrogênio Kjeldahl	mg L ⁻¹	7,01	6,78	31,3	25,2	27,2	15,7
Nitrogênio-Nitrato	mg L ⁻¹	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2
Nitrogênio-Nitrito	mg L ⁻¹	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1
Óleos e Graxas	mg L ⁻¹	< 10	< 10	< 10	11	< 10	< 10
Potássio	mg L ⁻¹	9,23	10	20,9	18,3	18	13,2
Sódio	mg L ⁻¹	36,3	39,6	108	83,9	99	61,4
Sódio Dissolvido Total	mg L ⁻¹	184	228	420	364	458	344
Sódio Total	mg L ⁻¹	240	228	480	470	518	368
Subst. Tensoat. Reagem c/ Azul Metileno	mg L ⁻¹	1,19	1,34	5,28	4,74	4,81	2,84
Turbidez	UNT	15,5	75,4	46,9	66,5	50	41,8
Zinco Total	mg L ⁻¹	0,04	0,05	0,15	0,27	0,22	0,41

Fonte: (CETESB, 2016)

Tabela 24. Parâmetros físico-químicos de campo, compostos orgânicos voláteis, ecotoxicológicos e químicos referente ao ano de 2016 do rio Tamanduateí

Descrição do parâmetro	Und.	20/01	03/03	18/05	28/07	21/09	09/11
Chuvvas nas últimas 24 h	-	Não	Sim	Sim	Não	Sim	Não
Coloração	-	Cinza	Marrom	Cinza	Cinza	Cinza	Cinza
Condutividade	µS cm ⁻¹	634	468	660	654	610,6	685,4
Oxigênio Dissolvido	mg L ⁻¹	< 0,21	0,59	1,03	< 0,21	0,43	0,27
pH	-	7,35	7,31	7,47	7,6	7,5	7,52
Temperatura da Água	°C	22,7	23,68	20,76	20,5	19,4	23,69
Temperatura do Ar	°C	21	23,9	17,2	17	22	22,3
Tipo de Parâmetros: Compostos Orgânicos Voláteis (COVs)							
Descrição do Parâmetro	Und.	20/01	03/03	18/05	28/07	21/09	09/11
Benzeno	µg L ⁻¹	< 2,5		< 2,5	< 2,5		< 2,5
Estireno	µg L ⁻¹	< 5		< 5	< 5		< 5
Etilbenzeno	µg L ⁻¹	< 2,5		< 2,5	< 2,5		< 2,5
<i>m,p</i> -Xileno	µg L ⁻¹	< 5		< 5	< 5		< 5
<i>o</i> -Xileno	µg L ⁻¹	< 2,5		< 2,5	< 2,5		< 2,5

Continuação da página anterior

Tolueno	µg L ⁻¹	5,93		4,3	9,25		8,38
Tipo de Parâmetro: Ecotoxicológicos							
Descrição do Parâmetro	Und.	20/01	03/03	18/05	28/07	21/09	09/11
Ens. Ecotoxic. c/ <i>A. fischeri</i>	CE ₂₀ (%)	12,6	> 81,9	15,8	3,02	61,9	31,5
Tipo de Parâmetros: Físicos e Químicos							
Descrição do Parâmetro	Und.	20/01	03/03	18/05	28/07	21/09	09/11
Alumínio Dissolvido	mg L ⁻¹	< 0,1	< 0,1	0,2	0,28	< 0,1	0,12
Alumínio Total	mg L ⁻¹	1,21	4,01	2,32	5,59	0,85	2,22
Arsênio Total	mg L ⁻¹	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01
Bário Total	mg L ⁻¹	0,07	0,08	0,06	0,07	0,05	0,07
Cádmio Total	mg L ⁻¹	< 0,0007	0,0009	0,0008	< 0,0007	< 0,0007	0,001
Carbono Organico Total	mg L ⁻¹	30,9	16,3	25,8	40,8	29,8	43,8
Chumbo Total	mg L ⁻¹	< 0,009	< 0,009	< 0,009	< 0,009	< 0,009	< 0,009
Cloreto Total	mg L ⁻¹	64,1	40,6	67,9	61,8	79,5	74,4
Cobre Dissolvido	mg L ⁻¹	0,03	< 0,009	0,03	0,02	0,03	0,03
Cobre Total	mg L ⁻¹	0,1	0,04	0,09	0,08	0,1	0,07
Cromo Total	mg L ⁻¹	0,02	0,04	0,03	0,05	0,03	0,04
DBO (5, 20)	mg L ⁻¹	89	39	84	< 3	102	98
Fenóis Totais	mg L ⁻¹	0,05	0,006	0,01	0,05	0,01	0,02
Ferro Dissolvido	mg L ⁻¹	0,56	0,2	0,45	0,36	0,43	0,51
Ferro Total	mg L ⁻¹	2,15	4,43	2,13	2,22	2,16	2,03
Fósforo Total	mg L ⁻¹	2,68	1,83	2,36	4,18	2,92	2,72
Manganês Total	mg L ⁻¹	0,25	0,22	0,22	0,11	0,17	0,17
Mercurio Total	mg L ⁻¹	< 0,0002	< 0,0002	< 0,0002	< 0,0002	< 0,0002	< 0,0002
Níquel Total	mg L ⁻¹	0,05	0,03	0,06	0,06	0,07	0,07
Nitrogênio Amoniacal	mg L ⁻¹	18,9	9,6	17,5	24,5	20	19,3
Nitrogênio Kjeldahl	mg L ⁻¹	25,6	13,1	25,6	35,1	25	23,3
Nitrogênio-Nitrato	mg L ⁻¹	< 0,2	0,53	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2
Nitrogênio-Nitrito	mg L ⁻¹	< 0,1	0,5	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1
Óleos e Graxas	mg L ⁻¹	15	< 10	15	22	< 10	< 10
Potássio	mg L ⁻¹	13,5	12,4	16,9	13,4	14,2	14,2
Sódio	mg L ⁻¹	62,7	49,2	54,8	66,9	66	73,4
Sólido Dissolvido Total	mg L ⁻¹	392	262	310	330	344	382
Sólido Total	mg L ⁻¹	434	308	384	440	402	466
Subst. Tensoat. Reagem c/ Azul Metileno	mg L ⁻¹	4,68	1,74	4,75	6,2	4,1	5,41
Turbidez	UNT	9,1	78,5	59,5	221	23	68,3
Zinco Total	mg L ⁻¹	0,24	0,17	0,28	0,25	0,46	0,63

Fonte: (CETESB, 2016)

Tabela 25. Parâmetros físico-químicos de campo, compostos orgânicos voláteis, ecotoxicológicos e químicos referente ao ano de 2016 do rio Pinheiros

Descrição do parâmetro	Und.	28/01	30/03	19/05	13/07	14/09	29/11
Chuvas nas últimas 24 h	-	Sim	Não	Sim	Não	Não	Sim
Coloração	-	Marrom	Preta	Preta	Preta	Preta	Cinza
Condutividade	$\mu\text{S cm}^{-1}$	291	507	438	567	626	198
Oxigênio Dissolvido	mg L^{-1}	1,84	0,56	0,66	0,31	0,24	0,7
pH	-	6,93	7,15	7,06	7	6,66	7,09
Temperatura da Água	$^{\circ}\text{C}$	24,07	26,6	19,4	20,15	22,7	23,23
Temperatura do Ar	$^{\circ}\text{C}$	24,5	26,1	15,8	20,6	23,8	22,6
Tipo de Parâmetros: Compostos Orgânicos Voláteis (COVs)							
Descrição do Parâmetro	Und.	28/01	30/03	19/05	13/07	14/09	29/11
Benzeno	$\mu\text{g L}^{-1}$	< 2,5		< 2,5	< 2,5		< 2,5
Estireno	$\mu\text{g L}^{-1}$	< 5		< 5	< 5		< 5
Etilbenzeno	$\mu\text{g L}^{-1}$	< 2,5		< 2,5	< 2,5		< 2,5
<i>m,p</i> ,-Xileno	$\mu\text{g L}^{-1}$	< 5		9,11	< 5		< 5
<i>o</i> -Xileno	$\mu\text{g L}^{-1}$	< 2,5		< 2,5	< 2,5		< 2,5
Tolueno	$\mu\text{g L}^{-1}$	4,18		87,8	86,6		< 2
Tipo de Parâmetro: Ecotoxicológicos							
Descrição do Parâmetro	Und.	28/01	30/03	19/05	13/07	14/09	29/11
Ens. Ecotoxic. c/ <i>A. fischeri</i>	CE ₂₀ (%)	> 81,9	18,9	12	3,71	6,89	> 81,9
Tipo de Parâmetros: Físicos e Químicos							
Descrição do Parâmetro	Und.	28/01	30/03	19/05	13/07	14/09	29/11
Alumínio Dissolvido	mg L^{-1}	0,5	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	0,2
Alumínio Total	mg L^{-1}	10,8	0,74	1,05	0,36	0,33	1,86
Arsênio Total	mg L^{-1}	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01
Bário Total	mg L^{-1}	0,07	0,07	0,06	0,07	0,06	0,03
Cádmio Total	mg L^{-1}	< 0,0007	< 0,0007	< 0,0007	< 0,0007	< 0,0007	< 0,0007
Carbono Organico Total	mg L^{-1}	13,7	29,2	25,3	33,4	73,2	12,6
Chumbo Total	mg L^{-1}	< 0,009	< 0,009	< 0,009	< 0,009	< 0,009	< 0,009
Cloreto Total	mg L^{-1}	18,7	38,5	32,6	42,9	48,2	14,2
Cobre Dissolvido	mg L^{-1}	< 0,009	< 0,009	0,01	0,02	< 0,009	< 0,009
Cobre Total	mg L^{-1}	0,04	0,02	0,03	0,05	0,02	0,02
Cromo Total	mg L^{-1}	0,03	< 0,02	0,03	< 0,02	< 0,02	< 0,02
DBO (5, 20)	mg L^{-1}	30	78	54	79	60	18
Fenóis Totais	mg L^{-1}	0,003	0,03	0,01	0,03	0,04	< 0,003
Ferro Dissolvido	mg L^{-1}	0,85	0,94	0,32	0,38	0,32	0,52
Ferro Total	mg L^{-1}	5,88	2,09	1,93	2,64	2,8	0,54
Fósforo Total	mg L^{-1}	1,05	2,73	1,93	2,64	2,8	0,54
Mangans Total	mg L^{-1}	0,16	0,2	0,18	0,17	0,17	0,09

Continua na página seguinte

Continuação da página anterior

Mercúrio Total	mg L ⁻¹	< 0,0002	< 0,0002	< 0,0002	< 0,0002	< 0,0002	< 0,0002
Níquel Total	mg L ⁻¹	< 0,02	< 0,02	< 0,02	0,03	< 0,02	< 0,02
Nitrogênio Amoniacal	mg L ⁻¹	7,35	17,8	15,1	18,8	25,6	4,21
Nitrogênio Kjeldahl	mg L ⁻¹	9,13	22,4	21,9	29,4	29,3	5,48
Nitrogênio-Nitrato	mg L ⁻¹	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2
Nitrogênio-Nitrito	mg L ⁻¹	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1
Óleos e Graxas	mg L ⁻¹	< 10	16	< 10	11	< 10	< 10
Potássio	mg L ⁻¹	7,41	11,2	10,4	12	11,9	4,47
Sódio	mg L ⁻¹	19,6	41,5	34,3	45,2	44,5	14,3
Sólido Dissolvido Total	mg L ⁻¹	146	256	246	278	338	136
Sólido Total	mg L ⁻¹	200	314	334	296	344	158
Subst. Tensoat. Reagem c/ Azul Metileno	mg L ⁻¹	2,33	5,21	4,06	6,06	5,93	1,78
Turbidez	UNT	62,9	37,2	72	10,2	37	38,2
Zinco Total	mg L ⁻¹	0,04	0,03	0,06	0,03	0,03	0,07

Fonte: (CETESB, 2016)

ANEXO B - Link para o currículo lattes.

<http://lattes.cnpq.br/4295215790828589>

ANEXO B - Ficha do aluno.

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9141 - 7305868/1 - Bruno de Souza

Email:	bsouza@usp.br
Data de Nascimento:	16/09/1989
Cédula de Identidade:	RG - 302863011 - SP
Local de Nascimento:	Estado de São Paulo
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Bacharel em Química - Universidade Federal de São Paulo - São Paulo - Brasil - 1989

Curso:	Mestrado
Programa:	Toxicologia e Análises Toxicológicas
Data de Matrícula:	17/07/2015
Início da Contagem de Prazo:	17/07/2015
Data Limite para o Depósito:	17/01/2018
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Elizabeth de Souza Nascimento - 17/07/2015 até o presente. Email: esnasci@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 17/07/2015
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 29/08/2016
Data do Depósito do Trabalho:	
Título do Trabalho:	
Data Máxima para Aprovação da Banca:	
Data de Aprovação da Banca:	
Data Máxima para Defesa:	
Data da Defesa:	
Resultado da Defesa:	
Histórico de Ocorrências:	Primeira Matrícula em 17/07/2015

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor a partir de 20/04/2013).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 17/07/2017

Impresso em: 15/01/2018 22:39:25

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9141 - 7305868/1 - Bruno de Souza

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5802-3/7	Tópicos Avançados em Toxicologia I	04/08/2015	16/11/2015	15	1	90	A	N	Concluída
FBC5803-3/6	Sistemas de Garantia da Qualidade em Laboratórios de Ensaio	18/08/2015	31/08/2015	30	0	-	-	N	Matrícula cancelada
PMI5704-5/5	Recuperação de Áreas Degradadas (Escola Politécnica - Universidade de São Paulo)	14/09/2015	14/12/2015	120	0	-	-	N	Turma cancelada
SAS5706-1/3	Toxicologia Ambiental (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	21/10/2015	02/12/2015	60	4	93	A	N	Concluída
TNMS801-3/1	Princípios e Aplicações da Espectrometria de Massas (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - Universidade de São Paulo)	25/02/2016	18/05/2016	120	8	80	A	N	Concluída
FBC5803-3/8	Sistemas de Garantia da Qualidade em Laboratórios de Ensaio	15/03/2016	28/03/2016	30	2	100	A	N	Concluída
QFL5709-5/1	Amostragem e Preparação de Amostra (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	16/03/2016	17/05/2016	90	6	100	A	N	Concluída
BE5709-4/3	Tópicos Especiais em Ecologia: Ecotoxicologia em Ecossistemas Aquáticos Continentais (Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo)	30/05/2016	12/06/2016	60	0	-	-	N	Turma cancelada
FBC5883-7/1	Avaliação da Toxicidade de Contaminantes em Amostras Ambientais	08/08/2016	04/09/2016	60	4	100	A	N	Concluída
PSP5301-1/1	Poluição das Águas: Avaliação, Prevenção, Controle e Gestão (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	13/09/2016	05/12/2016	60	4	83	A	N	Concluída
QFL5710-9/2	Sensores Químicos e Biossensores (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	30/09/2016	02/12/2016	90	0	-	-	N	Matrícula cancelada

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	29
Estágios:			
Total:	0	25	29

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997:
A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.
Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.