



CETESB

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL

**AVALIAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DA TOXICIDADE NO RIO
BAQUIRIVU-GUAÇU**

NOVEMBRO DE 2005

[Digite texto]

DOCUMENTO

<i>Tipo</i>	<i>Data</i>	<i>Origem</i>	<i>Nº Página / V</i>	<i>Nº Mapas</i>
Relatório Técnico	Set/05		20	

TÍTULO DO DOCUMENTO

Avaliação e Identificação da Toxicidade no Rio Baquirivu-Guaçu.

AUTOR RESPONSÁVEL

Assinatura / Carimbo / Data

AUTORES / ENTIDADES OU UNIDADES A QUE PERTENCEM

Sandra Valéria Buratini (EAHE)

DOCUMENTO AUTORIZADO POR

Assinatura / Carimbo / Data

DOCUMENTO REVISADO

Assinatura / Carimbo / Data

CLASSIFICAÇÃO DE SEGURANÇA

Externa Interna

Reservada

PALAVRAS CHAVES

Avaliação e Identificação da Toxicidade (AIT), Toxicidade, *Ceriodaphnia dubia*, Águas Superficiais.

CÓDIGO E TÍTULO DO PROJETO

OS 42.42.03.00 – Operação dos Atuais Sistemas de Avaliação da Qualidade de Águas Superficiais do Estado de São Paulo.

DISTRIBUIÇÃO INTERNA

Áreas / Nº de Cópias

EAHE (1); EAH (1); EEQL (1); ARDB (1).

USO DA BIBLIOTECA

<i>Classificação de Assunto</i>	<i>Nº Documento</i>	<i>Visto / Carimbo / Data</i>

TÍTULO DO DOCUMENTO

Avaliação e Identificação da Toxicidade no Rio Baquirivu-Guaçu.

RESUMO

Com o objetivo de apontar os agentes químicos responsáveis pela toxicidade observada nas águas superficiais de alguns pontos da Rede de Monitoramento do Estado de São Paulo, iniciou-se o desenvolvimento de estudos de Avaliação e Identificação da Toxicidade (AIT), com amostras coletadas no Rio Baquirivu-Guaçu (código BQGU 03200 – Bacia do Alto Tietê, Zona Metropolitana).

Foram realizadas quatro amostragens no ponto BQGU 03200, entre 2003 e 2005. Os resultados obtidos evidenciaram que o efeito tóxico a *Ceriodaphnia dubia* resultou, não apenas das elevadas concentrações de zinco, mas também da presença de compostos orgânicos não polares.

A aplicação dos procedimentos de AIT indicou, ainda, que são necessárias algumas modificações metodológicas e, também, a aquisição de reagentes, para uma completa identificação das substâncias passíveis de serem encontradas nessas amostras.

OBSERVAÇÕES



SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	2
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	3
2.1. Identificação do local de estudo	3
2.2. Amostragem	3
2.3. Água de diluição	4
2.4. Organismos-teste	4
2.5. Testes de toxicidade aguda.....	4
2.6. Procedimentos para Avaliação e Identificação da Toxicidade (AIT)	4
2.6.1. Fase I.....	4
2.6.1.1. Teste de toxicidade inicial	4
2.6.1.2. Teste de toxicidade base.....	5
2.6.1.3. Testes de toxicidade com ajuste do pH	5
2.6.1.4. Testes de toxicidade com filtração da amostra	5
2.6.1.5. Testes de toxicidade com aeração.....	5
2.6.1.6. Testes com extração em fase sólida (coluna C ₁₈)	6
2.6.1.7. Teste com adições de EDTA.....	6
2.6.1.8. Teste para redução de agentes oxidantes	6
2.6.1.9. Teste com graduação de pH	6
2.6.1.10. Análise estatística.....	7
2.6.2. Fase II.....	7
2.6.2.1. Compostos orgânicos não polares.....	7
2.6.2.2. Metais	8
3. RESULTADOS.....	9
3.1. Fase I.....	9
3.2. Fase II.....	13
4. CONCLUSÃO	15
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	15
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	16



1. INTRODUÇÃO

Desenvolvidos inicialmente para avaliar a toxicidade de substâncias químicas e para o controle do lançamento de efluentes líquidos (USEPA, 1985; CETESB, 1990), os testes de toxicidade com organismos aquáticos rapidamente se estenderam ao diagnóstico da qualidade das águas superficiais (de VLAMING et al, 2000), as quais, de modo similar aos efluentes, podem constituir misturas complexas, com a coexistência de diferentes substâncias em quantidades tóxicas.

Tendo em vista a identificação dos agentes responsáveis pelos efeitos tóxicos de efluentes, de forma que medidas mitigadoras possam ser implementadas e, posteriormente, avaliadas quanto à sua eficiência, foram elaborados protocolos para a execução de estudos de Avaliação e Redução da Toxicidade (em inglês TER, ou seja, Toxicity Reduction Evaluations). Um dos componentes destes protocolos são os estudos para Avaliação e Identificação da Toxicidade (em inglês, TIE – Toxicity Identification Evaluations) que, efetivamente, destinam-se à identificação dos agentes tóxicos (BURKHARD & ANKLEY, 1989).

Os estudos de Avaliação e Identificação da Toxicidade têm sido igualmente conduzidos com amostras de águas superficiais, com o propósito de isolar as fontes pontuais e/ou difusas responsáveis por sua toxicidade (de VLAMING et al, 2000), permitindo que medidas eficientes de controle possam ser tomadas.

Com o objetivo de apontar os agentes causadores da toxicidade, repetidamente observada em águas superficiais de alguns pontos da Rede de Monitoramento do Estado de São Paulo, iniciou-se a implantação dos estudos de Avaliação e Identificação da Toxicidade, com amostras coletadas no Rio Baquirivu-Guaçu. Trata-se de um manancial hipereutrófico, cujas águas vêm constantemente sendo enquadradas nas classes ruim e péssima. As elevadas concentrações de fósforo total e surfactantes, bem como as altas densidades de coliformes, refletem o aporte de esgoto doméstico sem tratamento. Também têm sido detectados nas amostras altos teores de metais (sobretudo alumínio, cobre e zinco), provenientes, provavelmente, das atividades agrícolas e industriais (galvanoplastia, entre outras), desenvolvidas nas adjacências e à montante (CETESB, 2003). Como consequência, todas as amostras coletadas nesse ponto nos últimos três anos têm causado efeito agudo a *Ceriodaphnia dubia*, tendo sido recomendada a investigação das fontes responsáveis (CETESB, 2004).

Dessa forma, além de adquirir experiência e conhecimento dos procedimentos de Avaliação e Identificação da Toxicidade descritos em USEPA (1991), pretende-se utilizar os resultados para direcionar e otimizar as ações de controle.



2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Identificação do local de estudo

As amostras foram coletadas no ponto da Rede de Monitoramento BQGU 03200, no Rio Baquirivu-Guaçu (Figura 1), situado na Bacia do Alto Tietê, Zona Metropolitana.



Figura 1: Rio Baquirivu-Guaçu, no ponto de coleta BQGU 03200.

2.2. Amostragem

Foram efetuadas quatro amostragens no Rio Baquirivu-Guaçu (25/08/03, 31/05/04 05/07/04 e 11/04/05). Em cada campanha foram coletados 5 L de amostra em frascos de polietileno para as análises pertinentes aos procedimentos do AIT. Na 2ª e 3ª amostragens foram coletados, também, 1 L de amostra em frasco de vidro âmbar para análise de compostos organofosforados, além de 500 ml em frascos de polietileno, preservados com HNO₃ até pH menor que 2,0, para análise de zinco, cobre e alumínio. As amostras foram transportadas em caixas de isopor contendo gelo para manutenção da temperatura na faixa recomendada (entre 6 e 10°C).

Imediatamente após a entrada de tais amostras no Laboratório de Ecotoxicologia Aquática, procedeu-se à separação de uma alíquota das mesmas para realização de algumas análises físicas e químicas, incluindo pH, oxigênio dissolvido, condutividade, dureza e cloro residual. Outra alíquota foi separada em frasco descartável de 250 ml e preservada com H₂SO₄ até pH menor que 2,0, sendo encaminhada para análise de amônia total. Estas análises também foram efetuadas com uma alíquota da amostra no 2º e 3º dias.



2.3. Água de diluição

Como controle e para preparo de todas as soluções-teste, utilizou-se a água do Reservatório do Ribeirão do Piraí, que é a água de cultivo dos organismos no Laboratório de Ecotoxicologia Aquática e que apresenta valores de pH e dureza próximos aos geralmente obtidos nas águas coletadas nesse ponto.

2.4. Organismos-teste

Foram utilizados organismos jovens de *Ceriodaphnia dubia*, com 6 a 30 horas de idade, cultivados no Laboratório de Ecotoxicologia Aquática, conforme SQ-IOT/LB-118.

2.5. Testes de toxicidade aguda

Utilizou-se o procedimento descrito em USEPA (1991), onde organismos jovens de *Ceriodaphnia dubia* são expostos a uma série de concentrações da amostra, utilizando-se 0.5 como fator de diluição. Foram preparadas 2-3 réplicas para cada concentração, adicionando-se alimento (2 gotas de suspensão algácea – *Selenastrum capricornutum* e 1 gota de ração para peixes ornamentais TETRAMIN® solubilizada) e 5 organismos por réplica. Os testes foram mantidos em incubadora a 25°C, com um fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro, durante 48 horas. Ao final deste período, registrou-se o número de organismos mortos obtidos em cada réplica.

2.6. Procedimentos para Avaliação e Identificação da Toxicidade (AIT)

2.6.1. Fase I

A fase I envolve testes que visam à caracterização das propriedades físicas e químicas dos agentes tóxicos da amostra. Assim, a amostra é dividida em alíquotas. Cada uma destas é submetida a uma manipulação física ou química diferente, de modo a alterar ou tornar biologicamente não disponível um determinado grupo de agentes tóxicos. Com as sub-amostras resultantes de cada manipulação, realiza-se um teste de toxicidade para detectar ausência, redução ou continuidade dos efeitos, verificando-se qual ou quais tratamentos são efetivos na remoção da toxicidade e proporcionando informações sobre a natureza do agente tóxico.

Na fase I, foram efetuados os seguintes procedimentos:

2.6.1.1. Teste de toxicidade inicial

Efetuada imediatamente após a entrada das amostras no laboratório, destina-se à obtenção da CL50;24h de modo a definir as concentrações de exposição a serem utilizadas nos demais testes desta fase.



2.6.1.2. Teste de toxicidade base

Ensaio com a amostra não manipulada, repetido sempre que um dos testes de caracterização é realizado. Destina-se a avaliar se há alteração da toxicidade da amostra ao longo do período de armazenamento. Além disso, a comparação do resultado deste teste com aqueles obtidos nos testes com a amostra após as diferentes manipulações, permite apontar aquelas que reduzem ou removem os efeitos (USEPA, 1991).

2.6.1.3. Testes de toxicidade com ajuste do pH

Duas alíquotas de 350 ml da amostra e também da água de diluição tiveram o pH ajustado, uma para 3.0 (pela adição de HCl 1N) e a outra para 11.0 (mediante a adição de NaOH 1N), mantendo-se outra alíquota de 350 ml no pH inicial. Uma sub-alíquota de cada (300 ml) foi reservada para os testes relativos a aeração, filtração e extração em fase sólida (coluna C₁₈); o volume restante de cada alíquota teve o pH reajustado para o valor inicial no momento da realização do respectivo teste de toxicidade.

A alteração do pH para valores extremos pode modificar a proporção de espécies químicas ionizadas e não ionizadas presentes na amostra, as quais podem ter propriedades físicas e químicas diferentes. Além disso, tais mudanças extremas de pH podem resultar em hidrólise ou precipitação de contaminantes, alterando sua biodisponibilidade.

2.6.1.4. Testes de toxicidade com filtração da amostra

Três alíquotas de água de diluição (pHs inicial, 3.0 e 11.0) foram filtradas em membranas de fibra de vidro de 1µm, passando a constituir os brancos dos testes de toxicidade da filtração. Na seqüência, três alíquotas de 250 ml de amostra com diferentes pHs foram filtradas na respectiva membrana (pH inicial, 3.0 e 11.0). No momento da realização dos testes de toxicidade, todas as alíquotas tiveram o pH ajustado para o valor inicial. Esta manipulação permite apontar sólidos filtráveis ou compostos cuja solubilidade é alterada por condições ácidas e básicas.

2.6.1.5. Testes de toxicidade com aeração

Este procedimento destina-se a verificar a ocorrência de compostos oxidáveis, voláteis ou flotáveis (cloro, peróxidos, surfactantes, etc.). Neste caso, três alíquotas de 50 ml da amostra e da água de diluição (com pH inicial e com ajuste para pH 3.0 e 11.0) foram transferidas para recipientes cilíndricos e submetidas à aeração durante uma hora, com verificação dos pHs a cada 5 minutos na primeira meia hora e a cada dez minutos na segunda meia hora. Após esse período, suspendeu-se a aeração, removendo-se as alíquotas de amostra com auxílio de pipetas volumétricas. No momento da realização dos testes de toxicidade, os pHs foram reajustados para os valores iniciais (USEPA, 1991).

A diferença de pH influi no estado de ionização de alguns compostos polares, tornando-os mais ou menos voláteis e, também, alterando o potencial redox do sistema (BURKHARD & ANKLEY, 1989).



Para detectar a presença de compostos flotáveis, os quais ficam aderidos às paredes do recipiente de aeração, foram adicionados 20 ml de água de diluição nos mesmos após a remoção das amostras, seguindo-se à uma agitação vigorosa. Posteriormente, esta água foi avaliada quanto à toxicidade.

2.6.1.6. Testes com extração em fase sólida (coluna C₁₈)

Por meio deste procedimento, procurou-se verificar a ocorrência de compostos orgânicos não polares na amostra. Assim, três alíquotas de água de diluição (pH inicial, 3.0 e 9.0), filtradas em membrana de fibra de vidro de 1 µm foram passadas pelas respectivas colunas de octadecil de 3 ml, previamente condicionadas pela passagem sequencial de metanol e água desionizada. Em seguida, três alíquotas de 200 ml da amostra (pH inicial, 3.0 e 9.0), foram passadas pela coluna correspondente, coletando-se dois volumes de cada uma (após a passagem de 25 e 150 ml) para a realização dos respectivos testes de toxicidade. Posteriormente, efetuou-se a eluição das colunas com metanol e testes de toxicidade com os eluatos, de forma a confirmar ou não a presença desses agentes na amostra (USEPA, 1991).

2.6.1.7. Teste com adições de EDTA

O EDTA é um agente quelante efetivo, capaz de produzir complexos relativamente não tóxicos de muitos metais. É utilizado para avaliar se a toxicidade da amostra pode ser atribuída à presença de metais catiônicos como bário, cádmio, cobalto, cobre, ferro, chumbo, manganês, níquel, estrôncio e zinco (BURKHARD & ANKLEY, 1989; USEPA, 1991). Assim, foram preparadas 3 séries de diluições da amostra, adicionando-se 0,2 ml da solução de EDTA na primeira, 0,05 ml na segunda e 0,0125 ml na terceira série. Após um período de 2 horas, no mínimo, foram adicionados os organismos-teste.

2.6.1.8. Teste para redução de agentes oxidantes

Utilizou-se o tiosulfato de sódio para detectar se o efeito tóxico das amostras poderia ser atribuído à ocorrência de substâncias oxidantes (cloro, peróxidos) e de alguns metais catiônicos (cobre, cádmio, mercúrio e prata). Utilizando um procedimento similar ao do teste com adições de EDTA, foram preparadas três séries de diluições da amostra, adicionando-se 0,5 ml da solução-estoque de tiosulfato na primeira série, 0,25 ml na segunda e 0,125 ml na terceira série. A adição dos organismos-teste ocorreu após um período de 2 horas, no mínimo.

2.6.1.9. Teste com graduação de pH

Permite a detecção de compostos sensíveis a variações do pH dentro da faixa fisiologicamente aceitável (6 a 9), caso de certos metais e da amônia. Nestes testes, três alíquotas de amostra e água de diluição tiveram o pH ajustado para 6.0/6.5, 7.0/7.5 e 8.0/8.5. Em seguida, para cada faixa de pH, prepararam-se as respectivas diluições da amostra, tomando-se o cuidado de preencher os recipientes de teste até a borda e vedá-los com filme de PVC para impedir a permanência do ar, fato que alteraria o pH (USEPA, 1991).



2.6.1.10. Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados por meio do Programa Trimmed Spearman-Kärber (USEPA, 2002), para obtenção de CL50;48h, ou seja, a concentração em que se observa letalidade de 50% dos organismos expostos durante esse período. Em seguida, devido à inexistência de critérios para definir se uma manipulação promoveu redução ou eliminação da toxicidade da amostra, aplicou-se uma fórmula proposta em USEPA (1985), a qual permite a comparação de dois valores de CL50 obtidos em testes distintos. Observou-se que, muitas vezes as diferenças apontadas como significativas por esta análise eram desprezíveis do ponto de vista ecotoxicológico, isto é, as razões entre as CL50s eram inferiores a 2 - fator considerado normal e aceitável para variabilidade em testes de toxicidade, segundo CHAPMAN (2000). Em função disso, assumiu-se que apenas diferenças superiores a 2 identificariam uma manipulação como efetiva na remoção dos efeitos tóxicos, dispensando-se tais cálculos e considerando-se apenas o resultado da razão entre a CL50 do teste com a alíquota das amostra após a manipulação e a CL50 do respectivo teste-base.

2.6.2. Fase II

Tem por objetivo isolar, por meio de técnicas de fracionamento seguidas de análises químicas apropriadas, o agente causador da toxicidade sugerido pelos resultados obtidos na Fase I. Para os compostos encontrados, obtêm-se os valores de CL50 existentes na literatura, comparando-os com as concentrações dos mesmos na amostra. Em seguida, confirma-se experimentalmente a CL50 dessas substâncias suspeitas, utilizando organismos-teste empregados na AIT (BURKHARD & ANKLEY, 1989; USEPA, 1993a).

Os resultados da Fase I, geralmente indicam a classe a que pertencem os compostos responsáveis pelo efeito tóxico, direcionando os procedimentos a serem seguidos na Fase II, os quais serão descritos a seguir. É importante ressaltar que, independentemente da natureza do agente tóxico a ser identificado, a Fase II inicia-se com a realização de um teste de toxicidade e, da mesma forma que na Fase I, todo e qualquer ensaio realizado com uma amostra manipulada deve ser acompanhado de um teste de toxicidade base.

2.6.2.1. Compostos orgânicos não polares

Os procedimentos da Fase II dirigidos à identificação destes compostos, iniciaram-se com a filtração de 2 litros de amostra em membranas de fibra de vidro de 1µm, seguida da passagem da mesma em duas colunas de octadecil (1 litro por coluna de 6 ml de capacidade e revestimento de 1000 mg). Estas foram previamente condicionadas pela passagem sequencial de 3 ml de metanol 25%, 50%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% e 100%. Cada um desses volumes foi coletado em frasco apropriado, correspondendo aos brancos da eluição a serem utilizados nas análises químicas e nos testes de toxicidade. Foram coletados três volumes de amostra pós-coluna (após a passagem de 25ml, 500 ml e 950 ml) e cada um foi testado para avaliar sua toxicidade (USEPA, 1993a).

Após a passagem da amostra, cada coluna foi eluída com três ml de cada uma das soluções de metanol (25%, 50%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% e 100%), sendo os mesmos coletados em



frascos apropriados. Estes eluatos da amostra foram utilizados em testes de toxicidade e, posteriormente, encaminhados para análises químicas. Para a realização dos testes com *Ceriodaphnia dubia*, adicionou-se uma alíquota de 150 µl de cada eluato ao respectivo béquer, contendo 10 ml de água de diluição.

2.6.2.2. Metais

Inicialmente, foram efetuados os testes da fase I que melhor caracterizam a contaminação por metais, ou seja, os testes com adição de volumes progressivos de EDTA ou tiosulfato de sódio à alíquotas da amostra bruta (USEPA, 1993a). Com base nos dados históricos de monitoramento (CETESB, 2003; CETESB, 2004), já a partir da segunda amostragem, solicitaram-se análises de alumínio, cobre e zinco, metais com probabilidade de ocorrência em concentrações potencialmente tóxicas a *Ceriodaphnia dubia*. Para tais determinações, utilizou-se a espectrometria ótica de emissão com plasma de argônio (APHA, 1998).

Além disso, os procedimentos da fase I indicaram que a toxicidade da amostra coletada em 31/05/2004 (2ª amostragem) seria atribuída a metais, mais especificamente ao zinco. Com isso, procedeu-se ao levantamento dos dados de CL50 do zinco para *C. dubia* disponíveis na literatura, efetuando-se, também, outra manipulação relativa à fase II. Esta correspondeu a um teste com adições de EDTA a uma série de diluições da água do Ribeirão do Pirai, contaminada com a mesma quantidade de zinco registrada na amostra, de forma a verificar a obtenção de valores de toxicidade comparáveis.

Nesse teste, primeiramente ajustou-se a dureza da água do Ribeirão do Pirai para um valor próximo ao registrado na amostra (Tabela 1), obtendo-se 85 mg/L em CaCO₃, 319 µS/cm de condutividade e 7,7 unidades de pH. Em seguida, pesou-se 0,0023g de sulfato de zinco heptahidratado e diluiu-se em 100 ml de água do Ribeirão do Pirai, preparada conforme descrito acima. Assim, obteve-se uma concentração de 5,2 mg/L em Zn²⁺, correspondendo à concentração desse metal registrada na amostra. A partir desta solução, agora equivalente à amostra bruta, efetuaram-se testes de toxicidade, preparando-se 4 séries de uma réplica, cada uma com as seguintes concentrações: 100%, 50%, 25% e 12%, além de um controle. Na primeira série não houve adição de EDTA, adicionando-se 0,2 ml, 0,05 ml e 0,0125 ml desse reagente na segunda, terceira e quarta séries, respectivamente. Finalmente, foram introduzidos 5 organismos em cada réplica, alimentando-se e incubando-se a 25°C, durante 48h.

Embora não desenvolvida neste trabalho, é importante mencionar que estes estudos incluem uma terceira fase, englobando procedimentos que evidenciam a correta identificação do agente tóxico, uma vez que as técnicas utilizadas nas fases I e II podem criar artifícios que conduzem a conclusões errôneas. Os meios utilizados na Fase III para eliminar tais incertezas incluem: estudos de correlação, sensibilidade relativa à espécie, observação de sintomas, contaminação, balanço de massas e técnicas de supressão (BURKHARD & ANKLEY, 1989; USEPA, 1993b).



3. RESULTADOS

Observando-se a tabela 1, verifica-se que as águas coletadas nesse ponto podem apresentar concentrações de oxigênio dissolvido inferiores aos limites recomendados para preservação da vida aquática. Conforme já exposto em CETESB (2003), a condutividade, as concentrações de amônia e de alguns metais frequentemente ultrapassam os valores estabelecidos para corpos d'água de Classe 3, na qual encontra-se enquadrado este rio.

Tabela 1: Resultados das análises físicas e químicas realizadas.

Parâmetro	Amostra			
	25/08/03	31/05/04	05/07/04	11/04/05
pH (unidades de pH)	6,9	7,2	7,4	7,05
Oxigênio dissolvido (mg/L)	2,2	7,3	5,2	4,3
Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	1017,0	320,0	345,0	244,0
Dureza (mg/L CaCO_3)	NR ⁽¹⁾	84,0	50,0	53,0
Amônia não ionizada (mg/L)	2,56	0,044	0,077	NR
Alumínio total (mg/L)	NR	4,1	1,05	1,00
Cobre total (mg/L)	NR	0,1	0,12	0,02
Zinco total (mg/L)	NR	5,2	0,12	0,10
Compostos orgânicos voláteis	NR	ND ⁽²⁾	ND	NR

(1) NR= Análise não realizada

(2) ND= Não detectado

3.1. Fase I

Em relação aos ensaios ecotoxicológicos, observou-se nas três primeiras campanhas que, uma vez detectada, a toxicidade se manteve ao longo do tempo, sem evidências de degradação. Tal fato é corroborado pelos valores similares de CL50 obtidos nos testes inicial e base 2^o e 3^o dias (Tabelas 2, 3 e 4).

Na amostra coletada em 25/08/03, obteve-se uma CL50;48h inicial de 17,7%. Após a execução dos procedimentos da Fase I da AIT, observou-se a eliminação do efeito tóxico nas alíquotas de amostra submetidas à filtração seguida de extração em fase sólida (coluna C₁₈), em todas as faixas de pH (sem ajuste e após ajuste para pH 3.0 e pH 11.0/9.0). Assim, após tal procedimento, a CL50;48h foi, no mínimo, quatro vezes e meia mais elevada que a registrada no respectivo teste base, uma vez que não se observou mortalidade na maior concentração testada, ou seja, 80% (Tabela 2). Além disso, foram constatadas reduções parciais de toxicidade (razão entre as CL50s inferior a 2) nas alíquotas de amostra submetidas à aeração em todos os valores de pH e após a filtração nos pHs 3.0 e 11.0 (Tabela 5).



Tabela 2: Resultados obtidos nos testes de toxicidade aguda com *Ceriodaphnia dubia* realizados com a amostra coletada em 25/08/03.

Dia	Teste	CL50;48h, em %	
1	Inicial	17,7 (NC) ⁽¹⁾	
	Base	17,7 (NC)	
2	Ajuste de Ph	3.0	14,14 (NC)
		11.0	20,00 (NC)
	Ajuste de pH/aeração	pH 3.0	28,28 (NC)
		pH Inicial pH 11.0	26,39 (23,14 a 30,10) 27,77 (NC)
Ajuste de pH/ Filtração	pH 3.0	28,28 (NC)	
	pH Inicial	17,41 (NC)	
	pH 11.0	30,31 (NC)	
3	Base	17,7 (NC)	
	Extração em coluna C ₁₈	pH 3.0 (após 25 ml)	>80,00 ⁽²⁾
		pH 3.0 (após 150 ml)	>80,00 ⁽²⁾
		pH Inicial (após 25 ml)	>80,00 ⁽²⁾
		pH 3.0 Inicial (após 150 ml)	>80,00 ⁽²⁾
		pH 11.0 (após 25 ml)	>80,00 ⁽²⁾
		pH 11.0 (após 150 ml)	>80,00 ⁽²⁾
	Adição de EDTA	0,2 ml	<20,00 ⁽³⁾
		0,05 ml	<20,00
		0,0125 ml	<20,00
Adição de Na ₂ S ₂ O ₃	0,5 ml	<20,00	
	0,25 ml	<20,00	
	0,125 ml	<20,00	
Eluato (Coluna C ₁₈)	pH 3.0	100% ⁽⁴⁾	
	pH Inicial	100%	
	pH 11.0	100%	

(1) Intervalo de confiança não calculável

(2) CL50;48h maior que 80% (maior concentração testada)

(3) CL50;48h menor que 20% (menor concentração testada)

(4) O eluato causou a mortalidade de 100% dos organismos-teste.

Dessa forma, pode-se dizer que a toxicidade dessa amostra teve como agentes primários compostos orgânicos não polares, pois o efeito tóxico foi removido nas amostras pós-colunas C₁₈, tendo sido recuperada após a eluição das mesmas com metanol (USEPA, 1991).

A amostra coletada em 31/05/04 apresentou-se mais tóxica em relação à anterior, com uma CL50;48h de 4,83% no teste-base efetuado no 2º dia e de 3,58% no teste-base relativo ao 3º dia (Tabela 3). Com a realização da Fase I do AIT, observou-se uma redução dos efeitos tóxicos na alíquota submetida à filtração em pH inicial, nas alíquotas com adição de EDTA e naquela submetida à filtração seguida de extração em fase sólida com pH 9.0 (Tabela 3). Em todos esses tratamentos, embora não tenha sido possível calcular, deduz-se que a diferença entre as CL50s é, no mínimo, 2,8 vezes superior (Tabela 5), pois não foi registrado efeito na maior concentração testada (10%). Tais resultados, aliados à não recuperação dos efeitos tóxicos após a eluição da coluna com metanol, apontam metais catiônicos como prováveis agentes responsáveis. As demais manipulações não alteraram ou apenas removeram parcialmente a toxicidade.



Tabela 3: resultados obtidos nos testes de toxicidade aguda com *Ceriodaphnia dubia* realizados com a amostra coletada em 31/05/04.

Dia	Teste	CL50;48h, em %	
1	Inicial	<6,25 ⁽¹⁾	
2	Base	4,83 (4,27-5,46)	
	Ajuste de pH	3.0 5,7 (4,54-7,16)	
		11.0 4,67 (3,76-5,78)	
	Ajuste de pH/aeração	pH 3.0 5,36 (4,32-6,64)	
		pH Inicial 6,16 (5,17-7,34)	
		pH 11.0 6,16 (5,17-7,34)	
3	Ajuste de pH/ Filtração	pH 3.0 6,16 (5,37-7,34)	
		pH Inicial >10,00 ⁽²⁾	
		pH 11.0 4,22 (3,36-5,29)	
	Base	3,58 (3,04-4,21)	
	Extração em coluna C ₁₈	pH 3.0 (após 25 ml)	4,27 (3,55-5,15)
		pH 3.0 (após 150 ml)	3,54 (NC)
		pH Inicial (após 25 ml)	6,60 (5,78-7,52)
		pH 3.0 Inicial (após 150 ml)	6,99 (NC)
		pH 11.0 (após 25 ml)	>10,00
		pH 11.0 (após 150 ml)	>10,00
	Graduação de pH	6.5	6,06 (5,00-7,35)
		7.5	4,35 (3,56-5,32)
8.5		3,24	
Adição de EDTA	0,2 ml	>10,00	
	0,05 ml	>10,00	
	0,0125 ml	>10,00	
Adição de Na ₂ S ₂ O ₃	0,5 ml	<2,5 ⁽³⁾	
	0,25 ml	<2,5	
	0,125 ml	<2,5	
Eluatos (coluna C ₁₈)	pH 3.0	NT ⁽⁴⁾	
	pH Inicial	NT	
	pH 11.0	NT	
Recuperação de substâncias flotáveis	pH 3.0	NT	
	pH Inicial	NT	
	pH 11.0	NT	

(1) CL50;48h menor que 6,25 (menor concentração testada) (2) CL50;48h maior que 10% (maior concentração testada)

(3) CL50;48h < 2,5 (menor concentração testada) (4) NT= Não tóxico

Embora correspondam às concentrações totais e não às frações biodisponíveis dos metais, as análises químicas efetuadas indicaram teores elevados de alumínio, cobre e zinco (Tabela 1), capazes de causar efeito agudo a *Ceriodaphnia dubia* em águas com dureza similar à da amostra (BELANGER et al, 1990; HOCKETT & MOUNT, 1996). O alumínio não tem sua toxicidade reduzida por nenhum dos dois agentes complexantes, embora apresente uma constante de estabilidade moderada (log K= 16,1) para formação de complexos com EDTA. Já o zinco e o cobre respondem ao EDTA, porém o zinco não responde ao tiosulfato, pois a constante de estabilidade para complexos de Zn²⁺ com esse agente é baixa (log K= 2,35)(HOCKETT & MOUNT, 1996). Assim, como não foi observada a redução de efeitos nas adições de tiosulfato, pode-se inferir que o zinco seria o metal responsável pela toxicidade ao microcrustáceo nesta amostra.



Com a terceira amostra, coletada em 05/07/04, foram obtidos resultados semelhantes aos da primeira, ou seja, uma CL50;48h entre 13,15 e 14,07, com remoção da toxicidade nas alíquotas de amostra submetidas à extração em coluna C₁₈ em todas as faixas de pH, e recuperação total dos efeitos nos eluatos com metanol (Tabela 4). Portanto, novamente, os procedimentos indicaram que compostos orgânicos não polares seriam a causa da toxicidade a *Ceriodaphnia dubia*.

Tabela 4: Resultados obtidos nos testes de toxicidade aguda com *Ceriodaphnia dubia* realizados com a amostra coletada em 05/07/04.

Dia	Teste	CL50;48h, em %	
1	Inicial	14,03 (NC) ⁽¹⁾	
2	Base	14,07 (12,87-15,38)	
	Ajuste de pH	3.0 11.0	13,44 (NC) 19,00 (15,26-23,66)
	Ajuste de pH/aeração	3.0 Inicial 11.0	13,44 15,43 (12,95-18,39) 17,73 (14,30-21,97)
	Ajuste de pH/ Filtração	3.0 Inicial 11.0	21,77 (17,76-28,29) 19,00 (15,26-23,66) 25,07 (21,98-28,59)
	Base		13,15 (9,52-17,61)
	Extração em coluna C ₁₈	pH 3.0 (após 25 ml) pH 3.0 (após 150 ml) pH Inicial (após 25 ml) pH 3.0 Inicial (após 150 ml) pH 11.0 (após 25 ml) pH 11.0 (após 150 ml)	>76,00 ⁽²⁾ >76,00 >76,00 >76,00 >76,00 >76,00
3	Graduação de pH	6.5 7.5 8.5	<19,00 ⁽³⁾ <19,00 <19,00
	Adição de EDTA	0,2 ml 0,05 ml 0,0125 ml	21,33 <19,00 19,00
	Adição de Na ₂ S ₂ O ₃	0,5 ml 0,25 ml 0,125 ml	<19,00 <19,00 <19,00
	Eluatos (Coluna C ₁₈)	pH 3.0 pH Inicial pH 11.0	100% ⁽⁴⁾ 100% 100%
	Recuperação de substâncias flotáveis	pH 3.0 pH Inicial pH 11.0	NT ⁽⁵⁾ 40% ⁽⁴⁾ 20%

(1) Intervalo de confiança não calculável (2) CL50;48h maior que 76% (Maior concentração testada) (3) CL50;48h menor que 19% (menor concentração testada) (4) % de mortalidade dos organismos-teste (5) NT = Não tóxico



Tabela 5: Razão entre as CL50s; 48h obtidas nas diferentes manipulações e a CL50;48h obtida no respectivo teste-base.

Dia	Tratamento		CL50 superior/CL50 inferior		
			25/08/03	31/05/04	05/07/04
2	Ajuste de pH	pH 3.0	1,25	1,18	1,05
		pH Inicial	1,25	1,48	1,02
		pH 11.0	1,13	1,2	1,35
	Aeração/ Ajuste de pH	pH 3.0	1,6	1,11	1,05
		pH Inicial	1,49	1,28	1,07
		pH 11.0	1,57	1,28	1,26
	Filtração/Ajuste de pH	pH 3.0	1,6	1,28	1,55
		pH Inicial	1,02	>2	1,35
		pH 11.0	1,71	1,14	1,78
	Coluna C ₁₈ (após 25 ml)	pH 3.0	>4,5 ⁽¹⁾	1,19	>5,8
	Coluna C ₁₈ (após 150 ml)	pH 3.0	>4,5	1,01	>5,8
	Coluna C ₁₈ (após 25 ml)	pH Inicial	>4,5	1,84	>5,8
	Coluna C ₁₈ (após 150 ml)	pH Inicial	>4,5	1,95	>5,8
	Coluna C ₁₈ (após 25 ml)	pH 9.0	>4,5	>2,8	>5,8
	Coluna C ₁₈ (após 150 ml)	pH 9.0	>4,5	>2,8	>5,8
3	Adição de EDTA	0,2 ml	<1,13 ⁽²⁾	>2,8	1,62
		0,05 ml	<1,13	>2,8	<1,45
		0,0125 ml	<1,13	>2,8	1,45

(1) Embora não seja possível efetuar o cálculo, a diferença foi considerada significativa pois é superior ao fator 2. Além disso, como não foi observado efeito na maior concentração testada, conclui-se que o tratamento removeu a toxicidade.

(2) Embora não seja possível efetuar o cálculo, a diferença não foi considerada significativa pois é inferior ao fator 2. Além disso, como foi observado efeito na menor concentração testada, conclui-se que o tratamento não alterou a toxicidade.

Assim, apesar da provável ocorrência de outros contaminantes (sugerida pela pequena redução do efeito tóxico observada em tratamentos como aeração e filtração), pode-se dizer que orgânicos não polares e/ou metais são os agentes determinantes da toxicidade das amostras coletadas nesse ponto do Rio Baquirivu-Guaçu. Os compostos orgânicos não puderam ser identificados e quantificados, pois os eluatos das três amostras não foram analisados devido ao equipamento estar desativado, aguardando manutenção, bem como à necessidade da aquisição de alguns padrões.

3.2. Fase II

Com relação à amostra coletada em 31/05/2004, onde o zinco foi indicado como agente causador da toxicidade, seguiu-se o procedimento adotado por HOCKETT & MOUNT (1996), verificando-se a toxicidade relativa ao metal na amostra. Para tanto, dividiu-se a concentração nominal do mesmo pela respectiva CL50;48h a *C. dubia* (obtida na literatura, em experimentos com água de diluição de dureza similar), expressando-se o resultado em unidades tóxicas. Assim, DIAMOND et al (1997) obtiveram uma CL50;48h para o zinco de 0,199mg/L em água com dureza entre 70 e 90 mg/L em CaCO₃. Dividindo-se a concentração total de zinco registrada na presente amostra (5,2 mg/L) por 0,199, obtém-se 26 unidades tóxicas. Tal valor



seria comparável àquele previsto para a amostra, correspondente a 20,7 unidades tóxicas no 2º dia e 27,9 unidades tóxicas no 3º dia.

No teste de referência, após o período de 48 h, efetuou-se a leitura, verificando-se que na série sem adição do agente quelante, houve mortalidade de 100% dos organismos em todas as concentrações. Tal fato mostra-se coerente com o resultado registrado na amostra, uma vez que a CL50;48h da mesma foi inferior a 10% (menor concentração testada). Na série com maior concentração de EDTA (0,2 ml), registrou-se remoção da toxicidade em todas as concentrações, enquanto na série com introdução do menor volume desse reagente observou-se a remoção do efeito tóxico apenas na concentração de 12%. Este último resultado também pode ser considerado similar ao registrado na amostra, onde a adição de 0,0125 ml de EDTA eliminou a toxicidade apenas na concentração de 10%.

Dessa forma, mesmo considerando as diferenças entre as duas matrizes (amostra e água de diluição contaminada com sulfato de zinco), que podem interferir na biodisponibilidade do metal, observa-se que os resultados foram similares, indicando que o zinco provavelmente seria o responsável pelo efeito tóxico da amostra em questão.

Manipulações relativas à Fase II também foram conduzidas com a amostra coletada em 11/04/2005. Contudo, a mesma não causou toxicidade ao microcrustáceo no teste inicial e nos testes de toxicidade base realizados no 2º e 3º dias. Apesar disso, com o objetivo de implementar a técnica, os procedimentos destinados à identificação dos compostos sugeridos na Fase I foram realizados. Os resultados, evidentemente, confirmaram a ausência de toxicidade nas seis alíquotas de amostra pós-coluna, bem como nas frações metanol/água (25%, 50%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% e 100%), utilizadas para eluição das mesmas. O mesmo foi observado nos testes com EDTA e tiosulfato de sódio, onde, nas adições de volumes maiores, obteve-se efeito decorrente das altas concentrações desses reagentes.

As análises dos metais nessa amostra (Tabela 1) revelaram que, alumínio, cobre e zinco estavam em concentrações bem inferiores às das amostras anteriores e, somente o zinco, em níveis capazes de causar algum efeito tóxico a *Ceriodaphnia dubia*. No que se refere aos compostos orgânicos, os mesmos não puderam ser analisados nos eluatos devido ao fato destes conterem água (utilizada para o preparo das soluções de metanol), a qual interfere no processo de extração utilizado pelo laboratório. Já a análise qualitativa, efetuada com a amostra bruta, revelou a presença de substâncias provenientes do lançamento de esgotos domésticos sem tratamento, como a cafeína (CAS nº 58-08-2) e o 1,3,4,6,7,8-hexahidro-4,6,6,7,8,8-hexametil-ciclopenta[g]-2-benzopiran (CAS nº 1222-05-05), um composto sintético do almíscar, utilizado em produtos de higiene pessoal e de limpeza. Este último e o difenil éter (CAS nº 101-84-8), também detectado na amostra, são classificados como perigosos ao ambiente e aos organismos aquáticos (www.rijkswaterstaat.nl; www.saccosrl.it/, acesso em 08/08/05). Nesta amostra, porém, certamente estavam complexados ou em quantidades inferiores às concentrações de efeito.



COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL

4. CONCLUSÃO

Os dados gerados no presente estudo, apontam compostos orgânicos não polares e zinco como agentes químicos responsáveis pelo efeito tóxico das amostras de água do Rio Baquirivu-Guaçu, registrado nos ensaios com *Ceriodaphnia dubia*.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Devido às limitações relacionadas às análises químicas e/ou à falta de reagentes, neste trabalho não foi possível efetuar a identificação das substâncias orgânicas. Assim, pretende-se avaliar o procedimento sugerido por DURHAN et al (1990) para remover a água das soluções de metanol, de modo a permitir as análises dos eluatos por cromatografia gasosa ou espectrometria de massa. Além disso, torna-se necessária a aquisição de reagentes específicos para identificação de algumas substâncias passíveis de serem encontradas nessas amostras ambientais (caso da zeolita e do butóxido de piperonil, utilizados para identificação de amônia e pesticidas organofosforados, respectivamente)



6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APHA. American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (AWWA, WPCF). 20^a Ed. Washington. 1998.

BAILEY, H. C.; KRASSOI, R.; ELPHICK, J. R.; MULHALL, A-M.; HUNT, P.; TEDMANSON, L. and LOVELL, A. 2000. Whole effluent toxicity of sewage treatment plants in the Hawkesbury-Nepean Watershed, New South Wales, Australia, to *Ceriodaphnia dubia* and *Selenastrum capricornutum*. Environmental Toxicology and Chemistry, v.19.nº1. p.72-81.

BELANGER, S.E. and CHERRY, D.S. 1990. Interacting effects of pH acclimation, pH and heavy metals on acute and chronic toxicity to *C. dubia* (Cladocera). Journal of Crustacean Biology. v.10(2). p.225-235.

BURKHARD, L. P. and ANKLEY, G.T. 1989. Identifying toxicants: NETAC's toxicity-based approach. Environmental Sciences and Technology, v.23.nº12. p. 1438-1443.

CETESB, 1990. Implementação de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos. Série manuais. 7p.

CETESB, 2003. Relatório de Qualidade das Águas Interiores do Estado de São Paulo.v.1. 271p.

CETESB, 2004. Relatório de Qualidade das Águas Interiores do Estado de São Paulo.v.1. 278p.

CHAPMAN, P. M. 2000. Whole effluent toxicity testing – usefulness, level of protection and risk assessment. Environmental Toxicology and Chemistry, v. 19, nº1. p. 3-13.

de VLAMING, V.; CONNOR, V.; DiGIORGIO, C.; BAILEY, H.C.; DEANOVIC, L.A. and HINTON, D.E. 2000. Application of whole effluent toxicity test procedures to ambient water quality assessment. Environmental Toxicology and Chemistry, v.19. nº1. p.42-62.

DIAMOND, J.M.; KOPLISH, D.E.; McMAHON III, J. and ROST, R. 1997. Evaluation of the water-effect ratio procedure for metals in a riverine system. Environmental Toxicology and Chemistry, v.16. nº3. p. 509-520.

DURHAN, E.J. ; LUKASEWYCZ, M. T. and AMATO, J. R. 1990. Extraction and concentration of nonpolar organic toxicants from effluents using solid phase extraction. Environmental Toxicology and Chemistry, v.9. p. 463-466.

HOCKETT, J. R. and MOUNT, D. R. 1996. Use of metal chelating agents to differentiate among sources of acute aquatic toxicity. Environmental Toxicology and Chemistry. v.15. nº10. p.1687-1693.



COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL

USEPA. 1985. Methods for measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organisms. EPA/600/4-85-013. 3rd Ed.

USEPA. 1991. Methods for Aquatic Toxicity Identification Evaluations: Phase I Toxicity Characterization Procedures. 2nd. Ed. EPA/600/6-91/003. Environmental Research Laboratory, Duluth, MN.

USEPA. 2002. Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. EPA/821-R-02-012. 5th. Ed.

USEPA. 1993a. Methods for Aquatic Toxicity Identification Evaluations: Phase II Toxicity Characterization Procedures for Samples Exhibiting Acute and Chronic Toxicity. EPA-600/R-92/080. Environmental Research Laboratory. Duluth, MN.

USEPA. 1993b. Methods for Aquatic Toxicity Identification Evaluations: Phase III Toxicity Confirmation Procedures for Samples Exhibiting Acute and Chronic Toxicity. EPA-600/R-92/081. Environmental Research Laboratory. Duluth, MN.

www.rijkswaterstaat.nl (acesso em 08/08/2005).

www.saccosrl.it. (acesso em 08/08/2005).



COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL

EQUIPE TÉCNICA

Adriana Rodrigues Tiritan (EAHE)
Liliana Inês Werner (EAHE)
Márcia Aparecida Aragão (EAHE)
Rosalina Pereira de Almeida Araújo (EAHE)
Sandra Valéria Buratini (EAHE)
Valéria Aparecida Prósperi (EAHE)

COLABORAÇÃO

Maria Yumiko Tominaga

SUPERVISÃO

Eduardo Bertoletti