



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro de Tecnologia e Ciências

Faculdade de Engenharia

Juliana Azevedo Sabino

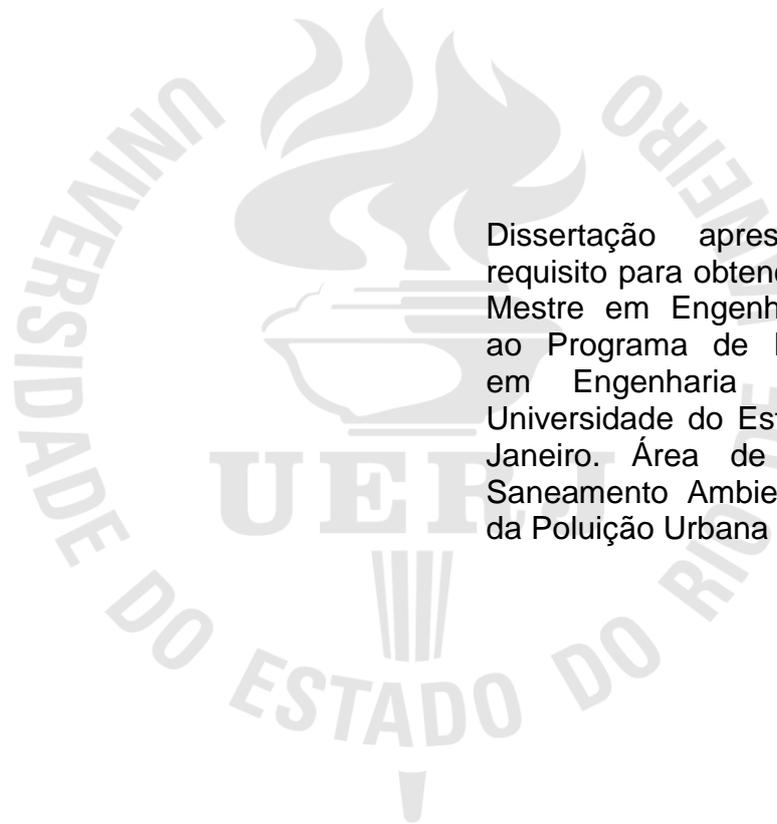
**Avaliação de Risco Ecológico Decorrente da Presença de
Micropoluentes na Sub-Bacia Hidrográfica Urbanizada do Rio João
Mendes, Niterói – RJ**

Rio de Janeiro

2018

Juliana Azevedo Sabino

**Avaliação de Risco Ecológico Decorrente da Presença de Micropoluentes na
Sub-Bacia Hidrográfica Urbanizada do Rio João Mendes, Niterói – RJ**



Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Engenharia Ambiental ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Saneamento Ambiental - Controle da Poluição Urbana e Industrial.

Orientador: Prof. Dr. André Luís de Sá Salomão

Rio de Janeiro

2018

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CTC/B

S116 Sabino, Juliana Azevedo.
Avaliação de risco ecológico decorrente da presença de micropoluentes na sub-bacia hidrográfica urbanizada do Rio João Mendes, Niterói - RJ / Juliana Azevedo Sabino. – 2018.
117f.

Orientador: André Luís de Sá Salomão.
Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Engenharia.

1. Engenharia ambiental - Teses. 2. Contaminantes emergentes na água - Teses. 3. Toxicidade aguda - Teses. 4. Poluição - Teses. 5. Avaliação de risco ecológico - Teses. I. Salomão, André Luís de Sá. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Engenharia. III. Título.

CDU 504.06

Bibliotecária: Júlia Vieira – CRB7/6022

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Juliana Azevedo Sabino

Avaliação de Risco Ecológico Decorrente da Presença de Micropoluentes na Sub-Bacia Hidrográfica Urbanizada do Rio João Mendes, Niterói – RJ

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Engenharia Ambiental ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Saneamento Ambiental - Controle da Poluição Urbana e Industrial.

Aprovada em 03 de abril de 2018.

Banca examinadora:

Prof. Dr. André Luís Sá Salomão (Orientador)
Faculdade de Engenharia - UERJ

Prof.^a. Dr.^a. Marcia Marques Gomes
Faculdade de Engenharia - UERJ

Prof. Dr. Fábio Veríssimo Correia
Instituto de Biociências - CCBS - UNIRIO

Rio de Janeiro

2018

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, por ter aberto todas as portas em que eu bati e por ter me sustentado quando eu achei que não fosse mais conseguir.

À minha amada mãe, por sempre estar ao meu lado, passando todos os sufocos necessários para que eu chegasse até aqui, pelo amor que me dedicou mesmo diante do meu mau humor, por entender minha ausência quando eu precisava me afastar do mundo para estudar e pelas noites de sono que encurtou por minha causa.

Ao meu irmão por todo amor que sempre me ofertou e pelas vezes em que se preocupou com minha caminhada.

Ao meu pai por sempre incentivar os meus estudos, mesmo estando um pouco longe e por ter provocado em mim o desejo de sempre buscar mais.

Aos meus avós (*in memoriam*) que sempre fizeram de tudo para o meu crescimento e pelas orações que direcionaram a mim, com certeza cheguei aqui graças a elas. Principalmente ao meu avô, pela memória de quem eu faço tudo até hoje, pois sei o quanto ficaria orgulhoso.

Ao meu amado e companheiro de vida, João Ricardo, por ter caminhado ao meu lado durante os últimos quase 11 anos, pelo apoio emocional e pela força moral que sempre me deu e por entender minha ausência quando foi preciso.

Aos meus amigos e familiares que entenderam que precisei estar ausente em muitas ocasiões e que mesmo assim continuaram me amando e me apoiando. Especialmente à amiga Tata, por me carregar nas costas em um bom pedaço dessa jornada e ao Jorge, por ter sido meu apoio durante o primeiro ano do mestrado, sem você eu nem teria feito minha inscrição.

Ao meu orientador, que me incentivou e me ajudou de todas as formas possíveis, sempre com um sorriso no rosto e com experiências incríveis para compartilhar. Sua paixão pelo trabalho foi uma motivação para seguir em frente.

Aos amigos do LABIFI pelas coletas e análises, por terem sido peças fundamentais para que esse trabalho fosse concluído, pelos momentos de descontração e por toda a ajuda e apoio que me deram. Especialmente a Janaína, Priscila e Ana por terem sido meus braços em boa parte dos experimentos, à Maíra pelo suporte com a metodologia da ARE e ao Rodrigo, pelas horas extras no laboratório.

E você aprende que realmente pode suportar... que
realmente é forte, e que pode ir muito mais longe
depois de pensar que não se pode mais.

William Shakespeare 1564-1616

RESUMO

SABINO, Juliana Azevedo. Avaliação de risco ecológico decorrente da presença de micropoluentes na sub-bacia hidrográfica urbanizada do rio João Mendes, Niterói – RJ. 2018. 119f. Dissertação (Mestrado Profissional em Engenharia Ambiental) - Faculdade de Engenharia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

A sub-bacia hidrográfica do rio João Mendes é um dos mais importantes contribuintes do sistema lagunar Piratininga/Itaipu na região oceânica de Niterói, no entanto, vem sofrendo com o constante lançamento de esgoto. A Avaliação de Risco Ecológico (ARE) é uma importante ferramenta para o gerenciamento de áreas contaminadas, pois avalia a probabilidade de ocorrência de efeitos ecológicos adversos como resultado da exposição a fatores de estresse. O objetivo deste trabalho foi contribuir para o diagnóstico ambiental a partir da avaliação dos riscos ecológicos da possível presença de micropoluentes nas águas superficiais dos rios que compõem a sub-bacia do rio João Mendes. Quatro coletas de monitoramento foram realizadas em 4 pontos, sendo um de referência (sem contaminação) e 3 com suspeita de contaminação por lançamento de esgoto. O modelo de ARE utilizado foi o proposto por Mendes, baseado na Tríade Holandesa, o qual integrou as linhas de evidência (LoE) química e ecotoxicológica para estimar o risco ambiental da área de estudo. Foram realizados o monitoramento dos parâmetros físico-químicos e de um grupo de substâncias de interesse químico (SQI) por cromatografia. Os ensaios ecotoxicológicos que integraram a LoE ecotoxicológica foram: avaliação de toxicidade crônica através da frequência de micronúcleos em peixes da espécie *Oreochromis niloticus* (Tilápia do Nilo) após 5 dias de exposição às amostras de água superficial, avaliação da inibição de crescimento da microalga *Raphidocelis subcapitata* após 4 dias de exposição, avaliação da reprodução em microcrustáceos da espécie *Ceriodaphnia dubia* após 7 dias de exposição às amostras de água superficial e verificação de atividade estrogênica através de ensaios realizados com cepa modificada da levedura *Saccharomyces cerevisiae* expostas às amostras ambientais de água superficial após 3 dias de exposição, utilizando a metodologia YES. O ponto amostral P_0 não apresentou diferença significativa quando comparado aos controles específicos dos ensaios de ecotoxicologia, e apresentou baixas concentrações das SQI e nos parâmetros de físico-química. Com isso, pode ser utilizado como ponto de referência no cálculo das LoE e da ARE para os 3 pontos de monitoramento (P_1 , P_2 e P_3). Os 3 pontos amostrais apresentaram Risco extremo ($>0,75$) em todas as coletas para ambas LoE (química e Ecotoxicológica), assim como no Risco Ecológico Integrado ($P_1 > 0,89$, $P_2 > 0,88$ e $P_3 > 0,88$). Os maiores riscos foram verificados nos pontos onde ocorreram as maiores concentrações de Bisfenol A e sulfametoxazol, sendo estes considerados como alguns dos possíveis responsáveis pelo risco extremo atribuídos a esses pontos e que tiveram no alto grau de toxicidade crônica nos ensaios ecotoxicológicos.

Palavras-chave: Tríade Holandesa, Risco Ambiental, Água Superficial, Descarga de Efluentes, Toxicologia Aquática.

ABSTRACT

SABINO, Juliana Azevedo. Ecological risk assessment due to the presence of micropollutants in the urbanized hydrographic sub-basin of João Mendes River, Niterói - RJ. 2018.

The sub-basin of the João Mendes river is one of the most important contributors to the Piratininga / Itaipu lagoon system in the Niterói oceanic region. However, it is suffering with the constant release of sewage. The Ecological Risk Assessment (ERA) is an important tool for the contaminated areas management, as it assesses the probability of occurrence of adverse ecological effects as a result of exposure to stress factors. The objective of this study was to contribute to the environmental diagnosis by assessing the ecological risks of the possible micropollutants presence in the surface waters of the rivers of the sub-basin of the João Mendes river. Four monitoring campaigns were carried out in four sampling points, one of them reference (without contamination) and three with suspected of sewage discharge contamination. The ERA model applied was proposed by Mendes, based on the Dutch Triad, which integrated chemical and ecotoxicological lines of evidence (LoE) to estimate the environmental risk of the study area. The physical-chemical parameters and a group of chemical substances of interest (CSI) were monitored by chromatography. The ecotoxicological assays that integrated the ecotoxicological LoE were: evaluation of chronic toxicity through the frequency of micronuclei in fish of the species *Oreochromis niloticus* (Nile Tilapia) after 5 days of exposure to surface water samples, evaluation of the inhibition of growth of the *microalga Raphidocelis subcapitata* after 4 days of exposure, evaluation of reproduction in microcracks of the *Ceriodaphnia dubia* species after 7 days of exposure to surface water samples and verification of estrogenic activity through tests performed with *Saccharomyces cerevisiae* yeast modified strain exposed to environmental samples of surface water after 3 days of exposure using the YES methodology. The sampling point P₀ did not present a significant difference when compared to the specific controls of the ecotoxicology assays and presented low concentrations of CSI and in the physicochemical parameters. Thus, it can be used as reference point in the LoE and ERA calculation for the 3 sampling points (P₁, P₂ e P₃). The three sampling points presented Extreme Risk (> 0.75) in all campaigns for both LoE (chemical and Ecotoxicological), as well as in Integrated Ecological Risk (P₁>0.89, P₂>0.88 e P₃>0.88). The highest risks were observed at the points where the highest concentrations of Bisphenol A and sulfamethoxazole occurred, being considered as some of the possible responsible for the extreme risk attributed to these points and that had in the high degree of chronic toxicity in the ecotoxicological tests.

Keywords: Dutch Triad, Environmental Risk, Surface Water, Sewage Discharge, Aquatic Toxicology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mapa das regiões administrativas do município de Niterói - RJ, com destaque em lilás para a Região Oceânica, onde está inserida a sub-bacia do rio João Mendes.

Figura 2: Limite territorial da Reserva Extrativista Marinha de Itaipu (área hachurada), localizada na Região Oceânica do Município de Niterói, RJ - Brasil.

Figura 3: Células de *Raphidocelis subcapitata*.

Figura 4: *Ceriodaphnia dubia* utilizada em ensaios ecotoxicológicos.

Figura 5: Mapas do Brasil, do Rio de Janeiro e de Niterói, com destaque para a Região Oceânica, na qual está localizada a Sub-Bacia do Rio João Mendes.

Figura 6: Localização dos afluentes e delimitação da Sub-Bacia Hidrográfica do Rio João Mendes, Niterói – RJ, Brasil.

Figura 7: Pontos amostrais P_0 e P_1 selecionados na sub-bacia do Rio João Mendes, Niterói – RJ, para a realização da Avaliação de Risco Ecológico.

Figura 8: Pontos amostrais P_0 e P_1 selecionados na sub-bacia do Rio João Mendes, Niterói – RJ, para a realização da Avaliação de Risco Ecológico.

Figura 9: Distribuição dos pontos de coleta ao longo da sub-bacia do Rio João Mendes, Niterói - RJ.

Figura 10: Sonda multiparâmetros marca Horiba, utilizado nas análises físico-químicas realizadas em campo.

Figura 11: Equipamento de Cromatografia Líquida de Ultra Performance UPLC-MS-MS TQD® XEVO (Waters) utilizado para a quantificação das substâncias químicas de interesse.

Figura 12: Incubadora onde foi realizado o cultivo das microalgas utilizadas nos ensaios à 24 °C, em luz constante.

Figura 13: Lâmina de Neubauer utilizada para a contagem de microalgas.

Figura 14: *Oreochromis niloticus* utilizados nos ensaios.

Figura 15: Eritrócitos de peixes utilizados para a análise de micronúcleos.

Figura 16: Esquema de preparo das placas de diluição.

Figura 17: Modelo Conceitual da Área.

Figura 18: Risco Químico referente às amostras coletadas nos pontos amostrais P₁, P₂ e P₃ na sub-bacia do Rio João Mendes, Niterói – RJ.

Figura 19: Gráficos resultantes dos ensaios ecotoxicológicos realizados com *R. subcapitata* nos pontos P₁, P₂ e P₃, indicando a taxa de desenvolvimento de biomassa algal nas amostras quando comparado ao P₀ e ao controle e as amostras tóxicas (*).

Figura 20: Gráficos resultantes dos ensaios ecotoxicológicos realizados com *O. niloticus* nos pontos P₁, P₂ e P₃, indicando a frequência de micronúcleos nas amostras quando comparado ao P₀ e ao controle e as amostras tóxicas (*).

Figura 21: Risco Ecotoxicológico referente às amostras coletadas nos pontos amostrais P₁, P₂ e P₃ na sub-bacia do Rio João Mendes, Niterói – RJ.

Figura 22: Risco Ambiental Integrado referente às amostras coletadas nos pontos amostrais P₁, P₂ e P₃ na sub-bacia do Rio João Mendes, Niterói – RJ.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Equivalente-estradiol quantificado para as amostras de água superficial da sub-bacia do Rio João Mendes, Niterói – RJ, referente aos pontos amostrais P₀, P₁, P₂ e P₃ durante as quatro coletas de coleta.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Coordenadas geográficas dos pontos amostrais P₀, P₁, P₂ e P₃.

Tabela 2: Parâmetros otimizados do MS/MS para a análise cromatográfica das substâncias químicas de interesse analisadas das amostras ambientais coletadas na sub-bacia do Rio João Mendes, Niterói-RJ.

Tabela 3: Parâmetros estatísticos referentes ao método de quantificação cromatográfica utilizado durante os ensaios referentes à LoE Química da ARE das amostras ambientais coletadas no P₀, P₁, P₂ e P₃ da sub-bacia do Rio João Mendes, Niterói - RJ.

Tabela 4: Soluções utilizadas para a preparação das amostras ambientais dos pontos P₀, P₁, P₂ e P₃ durante a realização dos ensaios com microalgas.

Tabela 5: Parâmetros experimentais adotados durante a realização dos ensaios ecotoxicológicos com *R. subcapitata*, segundo a norma ABNT-NBR: 12.648:2011.

Tabela 6: Parâmetros experimentais adotados durante a realização dos ensaios ecotoxicológicos com *Ceriodaphnia dubia*, segundo norma ABNT-NBR 13.373:2017.

Tabela 7: Resultados dos ensaios físico-químicos realizados com as amostras de água coletada do Rio João Mendes, Niterói – RJ, durante as 4 coletas de coleta, ocorridas nos meses de março, maio, julho e setembro/ 2017.

Tabela 8: Concentrações médias das SQI nos 4 pontos amostrais nos meses de março, maio, julho e setembro de 2017, sendo P₀ o ponto de referência.

Tabela 9: Valores médios (\pm DP) dos ensaios ecotoxicológicos crônicos realizados com *C. dubia* (em média de filhotes) e *R. subcapitata* (em nº de algas) para avaliação de efeito tóxico nos pontos P₀, P₁, P₂ e P₃ durante as 4 coletas.

Tabela 10: Valores médios dos ensaios crônicos realizados com *S. cerevisiae* para avaliação da atividade estrogênica (YES) e *O. niloticus* para avaliação da frequência de MN (‰), expostos às amostras ambientais.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas	RB - Resposta em Biomarcadores
AEIA - Área de Especial Interesse Ambiental	RC - Resolução CONAMA
APA - Área de Proteção Ambiental	RESEC - Reserva Ecológica
ARE - Avaliação de Risco Ecológico	RESEX - Reserva Marinha Extrativista
BPA - Bisfenol-A	RIAmb - Risco Ambiental
CE₅₀ - Concentração de efeito em 50% dos indivíduos	RIMA - Relatório de Impacto Ambiental
COT - Carbono Orgânico Total	RO - Região Oceânica
DD - Decisão de Diretoria	RRE - Resposta Relativa ao Estresse
DE - Desreguladores Endócrinos	SQI - Substâncias químicas de interesse
E1 - Estrona	SQT - Sediment Quality Triad
E2 - 17 β -estradiol	SST - Sólidos Suspensos Totais
EE2 - 17 α -etinilestradiol	ST - Sólidos Totais
EFS - Extração em Fase Sólida	STD - Sólidos Totais Dissolvidos
EIA - Estudo de Impacto Ambiental	STF - Sólidos Totais Fixos
ERA - Ecological Risk Assessment	STV - Sólidos Totais Voláteis
FMP - Faixa Marginal de Proteção	UPLC - Ultra Performance Liquid Chromatography
IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística	USEPA - United States Environmental Protection Agency
IE - Índice de Estresse	VMP - Valores Máximos Possíveis
INEA - Instituto Estadual do Ambiente do Rio de Janeiro	WoE - Weight of Evidences
ISO - International Organization for Standardization	YES - (Yeast Estrogen Screen)
IQA - Índice de Qualidade Ambiental	
LABIFI - Laboratório de Biorremediação e Fitotecnologias	
LoE - Line of Evidence	
MCA - Modelo Conceitual da Área	
MN - Micronúcleos	
OD - Oxigênio Dissolvido	
OECD - Organisation for Economic Co-operation and Development	
ORP - Potencial de Oxirredução	
PEAD - Polietileno de Alta Densidade	
PESET - Parque Estadual da Serra da Tiririca	
PMN - Prefeitura Municipal de Niterói	
PNEC - Predicted No-Effect Concentration	
PTFE - Politetrafluoretileno	

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	15
1. OBJETIVOS	18
1.1. Objetivo geral	18
1.2. Objetivos específicos	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1. A sub-bacia do Rio João Mendes no contexto da divisão territorial de Niterói	19
2.1.1. Descrição da Fauna e da Flora Locais	21
2.1.2. Importância da Reserva Extrativista Marinha (RESEX) Itaipu	23
2.1.3. O Processo de Urbanização no Entorno da Bacia	25
2.2. O Problema da Urbanização no Entorno dos Corpos Hídricos	26
2.3. O Lançamento de Poluentes nos Corpos Hídricos	27
2.4. Os Fármacos no Meio Ambiente	30
2.5. O Bisfenol-A no Meio Ambiente	34
2.6. Ensaio de Toxicidade em Ambiente Aquático	37
2.7. Bioindicadores Utilizados Para Avaliar a Ação dos Poluentes Aquáticos	39
2.7.1. Ensaio com <i>Oreochromis niloticus</i>	40
2.7.2. Ensaio com <i>Raphidocelis subcapitata</i>	42
2.7.3. Ensaio YES	45
2.7.4. Ensaio com <i>Ceriodaphnia dubia</i>	46
2.8. Legislações Reguladoras dos Poluentes em Ambientes Aquáticos	49
2.9. Modelo da Tríade Holandesa na Avaliação de Risco Ecológico	50
3. METODOLOGIA	56
3.1. Área de Estudo	56
3.2. Amostragem	58

3.3. Análises Referentes aos Parâmetros Físico-Químicos	61
3.4. Análises Referentes à Linha de Evidência (LoE) Química	63
3.4.1. Ensaio em Amostras de Água Superficial	62
3.4.2. Cálculo do Risco Químico	67
3.5. Análises Referentes à Linha de Evidência (LoE) Ecotoxicológica	68
3.5.1. Ensaio em Amostras de Água Superficial	68
3.5.1.1 Ensaio com Microalgas	68
3.5.1.2 Ensaio com Microcrustáceos	72
3.5.1.3 Ensaio com Peixes	73
3.5.1.4 Ensaio com Levedura pela Metodologia YES	75
3.5.2. Cálculo do Risco Ecotoxicológico	78
3.6. Cálculo do Risco Integrado e Peso das Evidências (WoE)	79
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	81
4.1. Modelo Conceitual da Área (MCA)	81
4.2. Parâmetros Físico-Químicos	82
4.3 Linha de Evidência Química	86
4.3.1. Água Superficial	86
4.3.2. Risco Químico	88
4.4. LoE Ecotoxicológica	90
4.4.1. Água Superficial	90
4.4.2. Risco Ecotoxicológico	94
4.5. Risco Ambiental Integrado	100
5. CONCLUSÃO	102
REFERÊNCIAS	103
APÊNDICES	116

INTRODUÇÃO

Bacias hidrográficas localizadas em áreas urbanas são geralmente impactadas com a ocupação crescente e desordenada, sem planejamento prévio e infraestrutura adequada de saneamento básico. Outro processo recorrente é a descaracterização com obras de canalização e retirada da mata ciliar (VIEIRA, 2003), principalmente para a construção às margens dos corpos hídricos. Como consequência, há o lançamento de resíduos e efluentes nos rios que compõem essas bacias.

Esgotos domésticos lançados no ambiente representam um dos problemas mais graves e crônicos de saúde humana e ambiental no Brasil. Segundo o MINISTÉRIO DAS CIDADES (2015), o volume de esgoto gerado e não tratado no Brasil é da ordem de 20 bilhões L/dia. Tal cenário é absolutamente incompatível com qualquer planejamento que vise à elevação do nível socioeconômico e sanitário de uma população e a preservação ambiental.

É crescente a preocupação da contaminação ambiental por micropoluentes emergentes que passam despercebidos por programas de monitoramento da qualidade da água (FURTADO *et al.*, 2015). Micropoluentes emergentes tem sido descritos como onipresentes e pseudo persistentes em esgotos, ecossistemas aquáticos e águas de abastecimento (TANG *et al.*, 2013). Alguns desses podem agir como desreguladores endócrinos (DE), pois possuem a capacidade de afetar direta ou indiretamente o sistema endócrino (hormonal) dos seres vivos (BILA & DEZOTTI, 2007). De acordo com a USEPA (*United States Environmental Protection Agency*) (USEPA, 1997) os DE são definidos como: *“um agente exógeno que interfere na síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação de hormônios naturais que são responsáveis pela manutenção da homeostase, reprodução, desenvolvimento e/ou comportamento”*.

A presença constante dos micropoluentes, assim como dos DE nos corpos hídricos urbanos deve-se principalmente pelo lançamento de efluentes domésticos e industriais sem o devido tratamento (CHAVES, 2016). No entanto, a presença dos micropoluentes e dos DE também em efluentes tratados pode ser verificada mesmo após sofrerem tratamento em ETE convencionais, onde

estes não são totalmente removidos (Salomão, 2014), e por este motivo, acabam chegando aos corpos hídricos.

A detecção e a quantificação dos micropoluentes com potencial efeito de desregulação endócrina (DE) em matrizes aquáticas são feitas basicamente por métodos de química analítica e por respostas biológicas. O método analítico mais utilizado para detectar e quantificar os micropoluentes em águas superficiais, após preparação ou extração da amostra é a cromatografia gasosa ou líquida seguida de espectrometria de massa (HALLGREN, 2009; RA *et al.*, 2011). Já as respostas biológicas são medidas principalmente por bioensaios em organismos aquáticos (HALLGREN, 2009, SALOMÃO *et al.*, 2014a, 2015). Estes também podem medir a combinação de efeitos (aditivo, sinérgicos ou antagonistas) do total de carga equivalente estrogênica, incluindo os efeitos causados por compostos não-alvos encontrados em águas residuais complexas, que não tenham sido identificados ou quantificados quimicamente (CLUBBS *et al.*, 2007, SALOMÃO *et al.*, 2014b).

A Avaliação de Risco Ecológico (ARE) é uma importante ferramenta para o gerenciamento de áreas contaminadas. Esta inclui ainda a identificação dos efeitos adversos dos contaminantes ao ambiente a partir de análises químicas, físico-químicas e biológica (SANCHEZ, 2012). A Environmental Protection Agency (USEPA, 1992) classifica a ARE como o processo que avalia a probabilidade de ocorrência de efeitos ecológicos adversos como resultado da exposição a fatores de estresse. Segundo MINES *et al.* (2009), a ARE é uma metodologia científica que visa quantificar ou identificar os riscos dos efeitos adversos de contaminantes ao ambiente, e tem por objetivo avaliar as alterações ecológicas ocasionadas pelas diversas atividades antropogênicas a um determinado sistema.

A sub-bacia hidrográfica do rio João Mendes é um dos mais importantes contribuintes do sistema lagunar Piratininga/Itaipu na região oceânica de Niterói, onde atualmente existe uma importante reserva marinha extrativista. Contudo, essa sub-bacia vem sofrendo transformações em sua vegetação, em função do processo de ocupação humana e crescimento populacional, além da falta de uma política de saneamento básico e o constante lançamento de esgoto, que transporta diversos tipos de poluentes para os rios que a constituem.

Por esses motivos, se faz necessária a realização de uma avaliação de risco ecológico para esse ambiente tão importante principalmente à nível ecológico, para compreender de que forma a proximidade com áreas urbanas e as atividades antrópicas estão alterando o equilíbrio daquele ecossistema e em qual intensidade.

1. OBJETIVOS

1.1. Objetivo geral

Contribuir para o diagnóstico ambiental a partir da avaliação dos riscos ecológicos associados à possível presença de micropoluentes em águas superficiais urbanas, dos rios que compõem a sub-bacia do rio João Mendes, na região oceânica de Niterói, RJ.

1.2. Objetivos específicos

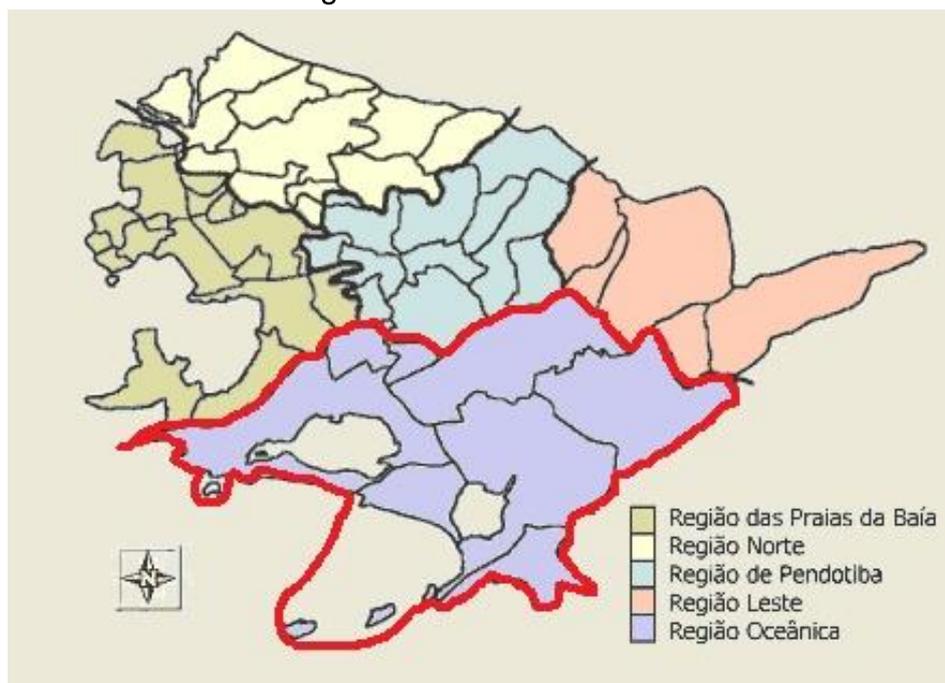
- Quantificar as substâncias químicas de interesse (SQI), Sulfametoxazol, Trimetropim, Ibuprofeno, 17- α etinilestradiol e Bisfenol-A, em amostras de água superficial urbana;
- Verificar os efeitos de toxicidade crônica, genotoxicidade e estrogenicidade em organismos aquáticos de três níveis tróficos distintos: microalgas da espécie *Raphidocelis subcapitata*, peixes da espécie *Oreochromis niloticus* e microcrustáceos da *Ceriodaphnia dubia* e uma cepa geneticamente modificada da levedura *Saccharomyces cerevisiae*;
- Calcular o risco ambiental integrado das duas linhas de evidência: química e ecotoxicológica.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A sub-bacia do Rio João Mendes no contexto da divisão territorial de Niterói

O município de Niterói está localizado no Estado do Rio de Janeiro e possui área aproximada de 134 km², segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2016). Sua unidade territorial está dividida em cinco regiões administrativas, segundo o Plano Diretor Municipal, instituído pela Lei nº 1157 de 04 de fevereiro de 1992, sendo elas: Região das Praias da Baía, Região Norte, Região de Pendotiba, Região Oceânica e Região Leste (Figura 1).

Figura 1: Mapa das regiões administrativas do município de Niterói - RJ, com destaque em vermelho para a Região Oceânica, onde está inserida a sub-bacia do rio João Mendes. Fonte: Google.



As subdivisões em regiões administrativas englobam os critérios de homogeneidade em relação à paisagem do município, ao tipo de uso dado às edificações e ao parcelamento do solo, além disso, são considerados os aspectos socioeconômicos, físicos e as delimitações das bacias hidrográficas municipais (Plano Diretor, 1992).

Em relação ao critério de delimitação por bacia hidrográfica, a cidade está dividida em três macrobacias, que são: Macrobaía da Baía de Guanabara,

Macrobaçia dos Rios Alcântara e Aldeia e Macrobaçia da Região Oceânica (NITERÓI, 2002). Essas macrobaçias são divididas em cinco baçias hidrográficas, são elas: Baçia da Baía de Guanabara, Baçia da Lagoa de Itaipu, Baçia da Lagoa de Piratininga, Baçia do Rio Alcântara e Baçia do Rio da Aldeia.

As Baçias Hidrográficas da Lagoa de Piratininga e da Lagoa de Itaipu estão localizadas na Região Oceânica (RO) do município e compreendem a área com maior densidade de cursos hídricos. Ambas estão divididas em sub-baçias, sendo a Baçia do Rio Jacaré a principal sub-baçia da Baçia da Lagoa de Piratininga e a Baçia do Rio João Mendes a principal sub-baçia da Baçia da Lagoa de Itaipu (FERREIRA, 2010).

Assim como se observa em outros municípios localizados na região metropolitana do Estado, a sub-baçia do Rio João Mendes sofre com impactos ambientais decorrentes do processo de crescimento urbano, sendo possível identificar ao longo dos anos: o aumento das áreas impermeáveis, provocando inundações; o aumento do desmatamento da mata ciliar para dar espaço a construções, que acabam ocupando a Faixa Marginal de Proteção; o assoreamento de vários trechos, inclusive da Lagoa de Itaipu; e a degradação da qualidade das águas, devido ao lançamento de esgoto *in natura* provenientes de residências da região, devido a deficiência na infraestrutura de saneamento (GALVÃO, 2008; BRAGA & AFONSO, 2016).

Embora não esteja inserida em nenhuma área de preservação, essa sub-baçia se encontra rodeada pelos limites da Reserva Ecológica Darcy Ribeiro e do Parque Estadual da Serra da Tiririca. Além disso, a qualidade da água da sub-baçia do rio João Mendes acaba causando impacto sobre a Reserva Marinha Extrativista localizada na praia de Itaipu. Isso ocorre devido ao seu deságue ocorrer nesta lagoa, que realiza troca hídrica com a praia através do canal de Itaipu (RIMA, 2014).

Como as alterações ambientais que ocorrem ao longo de uma baçia hidrográfica acabam influenciando a qualidade dos seus corpos hídricos, é importante primeiramente realizar uma investigação dos problemas que nela ocorrem, para que seja possível realizar um diagnóstico da situação dos seus cursos d'água (ABRAHÃO, 2006).

2.1.1. Descrição da Fauna e da Flora Locais

O município de Niterói está inserido na região de Floresta Ombrófila Densa, no domínio da Mata Atlântica (FERREIRA, 2010), sendo composto por vegetação ombrófila densa nas áreas montanhosas, passando por vegetações de influência lacustre e fluvial, localizadas ao longo da cidade, até chegar às áreas de mangue e restinga, localizadas próximo ao mar (EIA, 2014).

Embora no passado as áreas verdes ocupassem cerca de 80-90% do território, atualmente apenas 16% do município é coberto por Mata Atlântica, o que representa uma redução considerável, provocada inicialmente pela extração de pau-brasil, pelo cultivo de cana-de-açúcar e recentemente, pelo avanço imobiliário que a cidade vem sofrendo (FERREIRA, 2010).

A área florestada remanescente de Niterói está distribuída principalmente nas áreas montanhosas, o que inclui as áreas que abrangem o Parque Estadual da Serra da Tiririca, com vegetação em estágio de sucessão secundária, e a Reserva Ecológica Darcy Ribeiro, duas unidades de conservação de proteção integral, localizadas na Região Oceânica. A vegetação dessas áreas forma mosaicos que contrastam com a paisagem urbana, que é composta basicamente por indivíduos arbustivos típicos de paisagismo e gramíneas, geralmente de espécies invasoras (FERREIRA, 2010).

Como a vegetação existente principalmente na área urbana, sofre com o processo de expansão imobiliária e como representa um fator importante para a manutenção da qualidade ambiental nessas regiões, surge a necessidade de se criar unidades de conservação ou zonas de preservação desses ambientes (FERREIRA, 2010). Por esse motivo e pelo fato de ser um atrativo turístico devido às belas praias e trilhas em meio às florestas (duas maiores unidades de conservação de todo município), a Região Oceânica de Niterói é considerada a área verde de melhor estado de conservação do município. Além disso, a maior parte do Parque Municipal de Niterói, que também é uma Unidade de Conservação de proteção integral, está também inserida na Região Oceânica.

Além destas, cabe ressaltar que toda a Região Oceânica do município está inserida na Área de Proteção Ambiental (APA) de Lagunas e Florestas de Niterói, instituída pelo Plano Diretor Municipal, lei nº 1157 de 29 de dezembro de 1992. Também há na região de estudo, a Área de Especial Interesse Ambiental

(AEIA) para criação do Parque Municipal Bosque Lagunar de Itaipu, instituída pelo Plano Urbanístico da Região Oceânica, lei municipal nº 1968 de 04 de abril de 2002, que limita o uso do entorno e do espelho d'água desta lagoa.

Já em relação à fauna, estudos realizados na região apontam para uma grande diversidade, com inúmeras espécies de aves, répteis, mamíferos, anfíbios, peixes e seres invertebrados. Segundo o Estudo de Impacto Ambiental (EIA) elaborado em 2014 pela empresa AGRAR para a realização das obras da via Transoceânica, o município de Niterói possui 209 espécies da avifauna, sendo esse grupo o mais diverso, seguido da herpetofauna, com 77 espécies, mastofauna, com 60 espécies e por último, a ictiofauna encontrada na região, que possui 46 espécies.

A baixa riqueza de espécies da ictiofauna indica que os corpos hídricos localizados no município se encontram com a qualidade ambiental comprometida. Segundo dados de monitoramento do Instituto Estadual do Ambiente (INEA), no ano de 2015 o Rio João Mendes apresentava índice de qualidade ambiental variando entre ruim e muito ruim dos meses de março a dezembro, sendo no geral, o corpo hídrico de pior índice para a região do sistema lagunar Itaipu-Piratininga, o que corrobora a baixa riqueza da ictiofauna observada.

Por outro lado, a grande diversidade de espécies da herpetofauna e da avifauna encontrados no município se deve à presença de regiões florestadas, principalmente na região oceânica, que abriga diversas unidades de conservação e por isso, ainda possui uma considerável área de mata atlântica bem conservada.

O EIA realizado em 2014 ainda revela que de todas as 392 espécies de vertebrados computadas na área do município, 3 encontram-se ameaçadas, classificadas como em estado de perigo, segundo o sistema de classificação da portaria SEMA nº 01 de 04 de junho de 1998. Dentre elas, encontra-se o jacaré da espécie *Caiman latirostris*, o *Mazama americana*, também conhecido como veado-mateiro e a paca (*Agouti paca*).

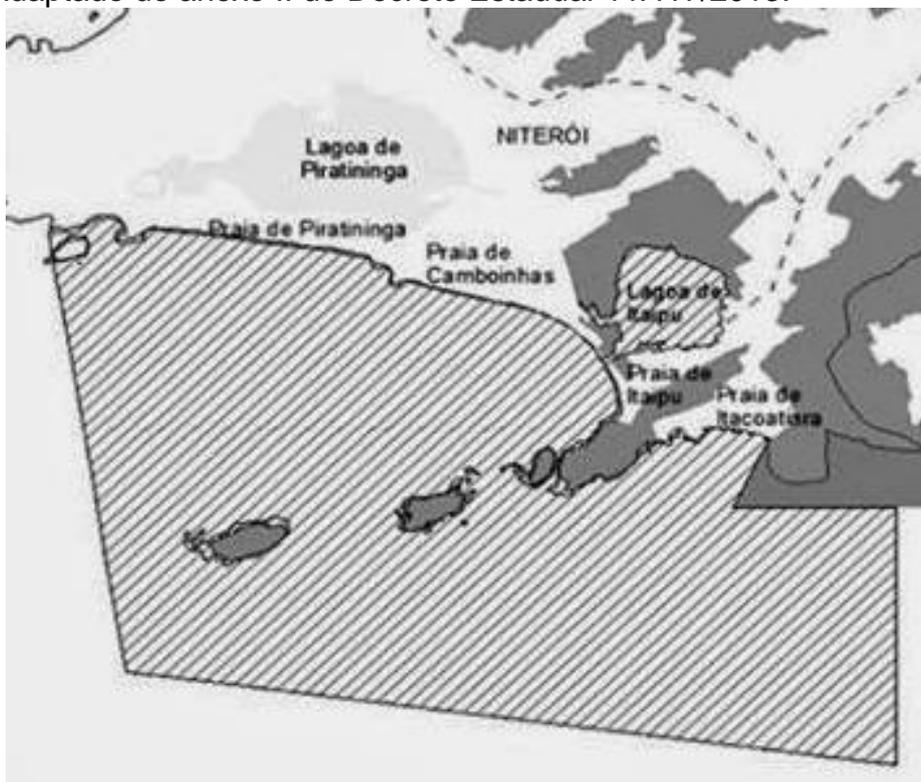
Ainda segundo o EIA (2014), se tratando especificamente do Rio João Mendes, em suas margens é possível observar a presença de gambás, da espécie *Didelphi saurita*, ouriços-amarelo (*Sphiggurus insidiosus*), além de aves das espécies *Dendrocygna viduata* (irerê) e *Aramides cajanea* (saracura-três-

potes). Já no seu baixo curso pode-se observar a presença de aves das espécies *Vanellus chilensis*, também conhecido como quero-quero e *Jacana jacana*, conhecido vulgarmente como jaçanã, além de lagartos das espécies *Ameiva ameiva* e *Cnemidophorus littoralis* e de alguns mamíferos como cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*), preá (*Cavia aperea*) e capivara (*Hydrocoeris hydrocaeris*).

2.1.2. Importância da Reserva Extrativista Marinha (RESEX) Itaipu

Além de todas as Unidades de Conservação já citadas, cabe ressaltar a importância da RESEX Itaipu. Essa reserva extrativista fica localizada na área marinha adjacente às praias de Itacoatiara, Itaipu, Camboinhas e Piratininga, e à Lagoa de Itaipu, (Figura 2), e foi criada através do Decreto Estadual nº 44.417, de 01 de outubro de 2013, com o objetivo de preservar a biodiversidade marinha da região e manter a pesca artesanal explorada pelos pescadores tradicionais que vivem no local.

Figura 2: Limite territorial da Reserva Extrativista Marinha de Itaipu (área hachurada), localizada na Região Oceânica do Município de Niterói, RJ - Brasil. Fonte: Adaptado do anexo II do Decreto Estadual 44.417/2013.



Com área equivalente a 3.943,28 hectares, a reserva abrange as praias mais frequentadas do município, sendo todas banhadas pelo oceano. Dentre elas, a praia de Itaipu vem apresentando o pior índice de qualidade ambiental, desde o ano 2000, segundo o Boletim de Qualificação Anual da Qualidade das Praias realizado pelo INEA.

A praia de Itaipu está ligada à lagoa de Itaipu através de um canal, que se encontra aberto permanentemente, permitindo que haja a troca hídrica e o deslocamento de organismos entre elas. A lagoa também se liga à lagoa de Piratininga, através do canal de Camboatá, formando o complexo lagunar Itaipu-Piratininga. Esse complexo é propício ao desenvolvimento de espécies marinhas ou estuarinas, sendo o habitat de muitas durante boa parte do seu desenvolvimento (MONTEIRO-NETO *et al*, 2008).

Como as lagoas estão interligadas e possuem abertura para as suas respectivas praias, o material lançado diretamente nelas ou em qualquer um dos canais às quais estão interligadas, pode chegar até as praias, alterando a qualidade das águas e conseqüentemente impactando a reserva extrativista. Além disso, nos últimos anos houve o aumento do fluxo de águas provenientes de ambientes eutrofizados, devido ao crescimento do lançamento de efluentes domésticos sem tratamento nos corpos hídricos. Isso ocorreu como consequência da ocupação desordenada da região e tem impactado a qualidade da água das lagoas (MONTEIRO-NETO *et al*, 2008; WASSERMANN & ALVES, 2004).

Cabe ressaltar que, 15,3% das espécies de ictiofauna encontradas na praia de Itaipu, também podem ser encontradas na sua respectiva lagoa, onde desenvolvem parte ou todo o seu ciclo de vida (MONTEIRO-NETO *et al*, 2008) e a redução da qualidade da sua água e da sua lâmina d'água, limitam o número de espécies que utilizam esse lugar como habitat. Dentre as espécies encontradas em ambos os ambientes, observa-se a ocorrência de diversos indivíduos que possuem valor comercial, sendo utilizados como fonte de renda para os pescadores da região.

Além da lagoa, a região costeira de Itaipu abrange diferentes habitats, incluindo um conjunto de ilhas, conhecidas como Ilhas do Pai, Mãe e Menina, que protegem a enseada do batimento das ondas (SALVADOR & SILVA, 2002), permitindo com que seja uma região propícia para a pesca e para o

desenvolvimento de diferentes espécies, como golfinhos e tartarugas, frequentemente observados pelos banhistas. Além dessas, a região abrange uma alta riqueza de espécies de peixes, sendo encontradas aproximadamente 183 espécies, segundo estudo realizado em 2008 por MONTEIRO-NETO e colaboradores.

Por se localizar em uma zona costeira, a reserva torna-se importante para a conservação da vida aquática, pois abrange uma região de transição ecológica entre os ambientes aquáticos e terrestres, que são extremamente dinâmicos e, como já mencionado, possuem grande diversidade de espécies, devido à maior troca genética e de biomassa que ocorre entre os dois ecossistemas (MONTEIRO-NETO *et al.*, 2008).

2.1.3. O Processo de Urbanização no Entorno da Bacia

A Região Oceânica de Niterói, que por muito tempo abrigou fazendas de cultivo de café e cana-de-açúcar, tem sido alvo de expansão urbana desde a década de 40. Foi nesse período que a Companhia de Desenvolvimento Territorial Itaipu S/A, criou o projeto de Loteamento denominado Cidade Balneária Itaipu, no qual foram aprovados lotes situados no interior das Lagoas de Itaipu e Piratininga (FERREIRA, 2010).

Ainda na década de 40, foram criados os Loteamentos Mar Azul e Alegre e o canal de Camboatá, que permitia a interligação da Lagoa de Piratininga com a Lagoa de Itaipu (FERREIRA, 2010). Ainda segundo Ferreira (2010), a criação desse canal visava evitar o alagamento das orlas das lagoas e promover a drenagem da região para que fosse loteada. Como resultado dessa obra, a lagoa de Itaipu perdeu uma parte significativa do seu espelho d'água e teve sua área dividida em lotes subaquáticos para serem comercializados. O mesmo ocorreu na Lagoa de Piratininga, onde esses lotes correspondem a 20% da sua área.

Embora o processo de urbanização tenha se iniciado na década de 40, alguns anos depois seu ritmo foi reduzido, retomando o crescimento na década de 70, principalmente após a inauguração da Ponte Rio-Niterói, em 1974, o que atraiu a atenção de grandes grupos imobiliários (FONTENELLE & CORRÊA, 2014).

Ainda segundo Fontenelle & Corrêa (2014), como os loteamentos pertenciam inicialmente a grandes empresas, elas conseguiram fazer com que o Estado investisse em um sistema adequado de infraestrutura para promover a moradia na região, o que faz com que seu processo de crescimento se estenda até os dias atuais.

Os condomínios originados a partir do loteamento da Região Oceânica se tornaram uma opção para aqueles que queriam morar bem e com segurança. Isso fez com que as propriedades e os terrenos fossem economicamente valorizados, modificando assim a distribuição espacial das classes sociais (FERREIRA, 2010). Com isso, a população de baixa renda migrou para regiões de encosta e para áreas desocupadas de loteamentos antigos, enquanto a classe mais alta ocupava as áreas mais planas e centrais da região (FERREIRA, 2010).

Como o crescimento demográfico foi muito intenso nesse período, cerca de 660% entre a década de 70 e os anos 2000, os loteamentos avançaram desordenadamente em direção às encostas florestadas e às orlas dos rios (BARROS, 2008). Com isso, houve perda da vegetação na área que compreende a Bacia Hidrográfica da Região Oceânica, tendo sido reduzida em 26,7% entre 1940, período no qual se iniciaram os loteamentos da região, e 1996 (FERREIRA, 2010).

Ainda de acordo com Barros (2008), a falta de saneamento básico nesse ambiente de crescimento acelerado fez com que os rios se transformassem em valões, devido ao lançamento de esgotos *in natura*. Como eles desaguam nas lagoas, carregam poluentes até elas e delas até o mar.

2.2. O Problema da Urbanização no Entorno de Corpos Hídricos

Durante o processo de urbanização, é comum encontrar edificações construídas às margens dos corpos hídricos ou ainda sobre canais que foram aterrados, canalizados ou que tiveram seus cursos desviados (GALVÃO, 2008). Como consequência dessas ações, há um aumento da frequência de enchentes nos períodos mais chuvosos, devido às alterações no canal de drenagem natural.

Além disso, a supressão da vegetação da mata ciliar provoca a ocorrência de eventos erosivos, o que faz com que os sedimentos se desprendam e se depositem nos leitos dos rios, provocando o seu assoreamento (GALVÃO, 2008).

O crescimento desordenado muitas vezes não acompanha a capacidade de atendimento da rede de infraestrutura disponível. Com isso, ocorrem os lançamentos de efluentes, muitas vezes sem qualquer tipo de tratamento, nas redes de águas pluviais ou diretamente nos corpos hídricos, devido à ausência de redes coletoras de esgoto (GALVÃO, 2008).

Há também o problema relacionado à disposição inadequada de resíduos sólidos. Algumas residências se desenvolvem em áreas onde não há coleta de resíduos, ou onde ela não é efetiva e a solução encontrada por muitos moradores é realizar a queima desses resíduos ou jogá-los nas encostas e nos canais naturais de drenagem. Com isso, pode haver contaminação dos corpos hídricos devido à natureza dos seus constituintes. Esses resíduos também podem comprometer o fluxo de água dos canais de drenagem, se acumulando próximo aos locais de lançamento e contribuindo para a ocorrência de enchentes.

2.3. O Lançamento de Poluentes nos Corpos Hídricos

Os corpos hídricos de água doce são comumente utilizados para abastecimento humano, irrigação, além de servirem de fonte de matéria prima para as indústrias, para a geração de energia elétrica, transporte e para a pesca (ABRAHÃO, 2006). No entanto, devido à proximidade dos ambientes urbanos, devido à falta de infraestrutura ou ainda de conscientização, algumas vezes eles acabam sendo utilizados como destino final de efluentes que não recebem qualquer tratamento, o que compromete a qualidade da sua água (ABRAHÃO, 2006).

Independentemente da sua origem, existem duas maneiras desses poluentes chegarem aos corpos hídricos, podendo ser por lançamentos pontuais ou por lançamentos difusos. No primeiro caso, os poluentes atingirão os corpos d'água de forma concentrada, enquanto no segundo eles atingirão o corpo

receptor através do despejo por diversos pontos ao longo de sua extensão (ABRAHÃO, 2006).

O lançamento de poluentes nos corpos hídricos leva à alteração da sua composição e à redução da sua qualidade ambiental, prejudicando o equilíbrio ecológico e o abastecimento (GIORI, 2011). O impacto provocado irá variar de acordo com as características do corpo hídrico, como por exemplo, a sua capacidade de assimilação e dos poluentes, tais como sua capacidade de solubilização e dispersão, sua lipofilicidade, concentração, capacidade de biotransformação e de bioacumulação (ABRAHÃO, 2006; BILA & DEZOTTI, 2007; GIORI, 2011).

Quando o lançamento ocorre em corpos hídricos que possuem capacidade de diluição dos compostos químicos que são lançados, como por exemplo, ambientes costeiros e baías, os riscos à saúde dos usuários desse recurso são menores, mas quando o lançamento ocorre em corpos hídricos que não possuem essa capacidade de diluição, como rios e lagos, o risco para a população aumenta exponencialmente (LEITE, 2004).

As respostas e os efeitos sobre os organismos também irão variar de acordo com fatores como o tempo de exposição e a capacidade de metabolização e excreção dos compostos (BILA & DEZOTTI, 2007). Todas essas características serão importantes para planejar as intervenções necessárias para mitigação dos danos.

Dentre as diversas formas de poluição química, uma das mais comuns em áreas urbanas e a mais representativa é a introdução de nutrientes e matéria orgânica pelo lançamento de efluentes não tratados, principalmente de origem doméstica, já que o Brasil ainda não possui uma rede adequada de infraestrutura para coleta e tratamento de esgoto, mesmo nos maiores centros urbanos (LEITE, 2004).

Ao chegarem aos corpos hídricos, esses poluentes normalmente são degradados por microrganismos que utilizam o oxigênio que está dissolvido (OD) na água durante o processo e por ser um elemento essencial para a sobrevivência da maioria dos organismos aquáticos, sua redução pode acarretar a morte de diversos indivíduos, como peixes, por exemplo (ESTEVES, 1998).

Além disso, o aumento da carga de nutrientes provoca um aumento na proliferação de algas, o que reduz a luminosidade nas regiões mais profundas,

comprometendo a fotossíntese dos indivíduos que ali habitam, levando-os à morte e, conseqüentemente, mais uma vez ao aumento da matéria orgânica disponível para a decomposição (ESTEVES, 1998). O resultado desses processos é a eutrofização desse ambiente, comprometendo assim os seus diversos usos e o equilíbrio ecológico ao seu redor.

Como os poluentes lançados em um corpo hídrico não ficam restritos à sua área de lançamento, sendo capazes de se difundir ao longo do seu curso, podendo comprometer toda a sua bacia hidrográfica, é necessária a realização de programas de monitoramento e recuperação deste ambiente, para evitar impactos ambientais de maiores amplitudes (LEITE, 2004). Para diminuir o impacto e dar início à sua recuperação, é necessário que a carga orgânica seja reduzida, o que significa que deve haver uma diminuição do lançamento de efluentes não tratados, para que o corpo hídrico consiga realizar a estabilização dessa carga (ABRAHÃO, 2006).

Junto com esses efluentes, pode haver o descarte de compostos farmacêuticos utilizados no dia a dia e que não são completamente metabolizados no organismo. Esses compostos, ao chegarem aos corpos hídricos, interagem com o ambiente podendo provocar desequilíbrios ecológicos diversos, podendo-se citar como exemplo a possibilidade de bioacumulação nos organismos, já que a maioria dessas moléculas é lipofílica e possui baixa degradabilidade (SPONCHIADO *et al*, 2011).

Também pode haver o lançamento de compostos com ação desreguladora do sistema endócrino excretados pelo organismo humano, sejam eles produzidos pelo próprio corpo, ou ingeridos sob a forma de fármacos, como hormônios. Estes, muitas vezes possuem efeitos irreversíveis na biota dos corpos hídricos, como a feminização de peixes machos ou atrofia dos seus órgãos sexuais e o comprometimento do crescimento corporal de peixes, entre outros organismos aquáticos (BILA & DEZOTTI, 2007).

O lançamento de efluentes industriais também constitui uma significativa fonte de poluentes nos ambientes aquáticos. Esses efluentes podem possuir compostos tóxicos e metais pesados, além de compostos comuns também em efluentes de origem sanitária (ABRAHÃO, 2006).

Os compostos tóxicos e os metais pesados possuem a capacidade de bioacumular no organismo dos seres vivos, podendo provocar efeitos severos

após um determinado período de exposição e que irão variar de organismo para organismo (BILA & DEZOTTI, 2007). Alguns também possuem a capacidade de se biomagnificar, o que significa que eles podem ser transmitidos ao longo da cadeia trófica.

2.4. Os Fármacos no Meio Ambiente

Contaminante emergente é uma classe de compostos químicos que ocorrem naturalmente ou são inseridos no ambiente e que podem causar algum tipo de risco ambiental e não possuem legislação específica reguladora, não estando, portanto, incluídos em programas de monitoramento ambiental (RAIMUNDO, 2011).

Os fármacos são uma classe de compostos químicos classificados como contaminantes ambientais emergentes, que são utilizados amplamente para tratamentos médicos humanos e veterinários, desenvolvidos para persistirem no organismo por até longos períodos, sendo classificados de diferentes formas de acordo com seu método de ação, como por exemplo: antibióticos, antidepressivos, hormônios contraceptivos, analgésicos, entre outros (FENT *et al*, 2005). Fármacos são micropoluentes amplamente utilizados pela população, muitas vezes sem a necessidade de prescrição médica. No entanto, não existem políticas públicas efetivas para a coleta desses compostos após o vencimento e como consequência, são grandes as chances de serem encontrados em corpos hídricos devido ao despejo inadequado de efluentes e resíduos sólidos (LIMA *et al*, 2017).

Dentre as diversas classes de fármacos encontradas no mercado, uma das mais preocupantes do ponto de vista ambiental é a dos antibióticos, como o sulfametoxazol e o trimetopim, por exemplo. Quando esses compostos são descartados no ambiente, são capazes de provocar a indução de resistência de bactérias patogênicas aos antibióticos ou ainda efeitos genotóxicos em peixes, dentre outros (LIMA *et al*, 2017). Eles são micropoluentes amplamente utilizados pela população, muitas vezes sem a necessidade de prescrição médica. No entanto, não existem políticas públicas efetivas para a coleta desses compostos após o vencimento e como consequência, são grandes as chances de serem

encontrados em corpos hídricos devido ao despejo inadequado de efluentes e resíduos sólidos (LIMA *et al*, 2017).

Diversos estudos apontam um crescimento na fabricação e na utilização desses compostos, que nem sempre são completamente metabolizados no organismo, sendo muitas vezes eliminados através das fezes e urina em sua forma natural ou na forma de compostos derivados ou conjugados com moléculas polares (HEBERER, 2002; LINDQVIST *et al*, 2005). Além disso, eles nem sempre conseguem ser removidos do efluente nas ETE, o que acarreta o seu lançamento nos corpos hídricos, provocando contaminação de rios, lagos, estuários e até mesmo de reservatórios de água subterrânea, que também podem ser contaminados através da lixiviação em aterros sanitários. Por esses motivos, essa classe de produtos vem sendo estudada em relação aos potenciais efeitos adversos sobre a fauna e a flora aquática (FENT *et al*, 2005).

Ainda hoje, pouco se sabe sobre os efeitos que esses compostos podem causar nos organismos, tanto terrestres quanto os que vivem nos ambientes aquáticos, sendo esses últimos bioindicadores extremamente importantes, já que estão sujeitos ao contato com as águas residuais ao longo de toda a sua vida (FENT *et al*, 2005). Também se sabe que esses compostos ocorrem muitas vezes na forma de misturas no ambiente, mas a maioria dos estudos se concentra apenas na avaliação dos fármacos como compostos unitários (CLEUVERS, 2003, 2004).

Essas substâncias se apresentam em quantidades traço nos ambientes aquáticos ao redor de todo o mundo e, embora apresentem um baixo risco de provocar efeitos tóxicos agudos, pouco se sabe acerca dos possíveis efeitos crônicos que são capazes de causar sobre a biota aquática, pois esses efeitos raramente são objetos de estudo (FENT *et al*, 2005; ROSA, 2008).

Um dos motivos relacionados a pouca informação sobre os possíveis efeitos que esses compostos podem causar no ambiente é que as agências de saúde são os órgãos reguladores dessas drogas e não consideram os efeitos que elas podem provocar no ambiente, apenas na saúde dos seres humanos, pois até pouco tempo atrás, esses compostos não eram considerados agentes potencialmente tóxicos aos receptores ambientais (ROSA, 2008).

Seu lançamento nos corpos hídricos pode ocorrer por diferentes vias, sendo o lançamento por despejos de efluentes domésticos *in natura* ou tratados, o mais comum (FENT *et al*, 2005). Eles também podem chegar aos corpos hídricos através do lançamento de efluentes industriais, laboratoriais e hospitalares, bem como pelo lançamento de resíduos sólidos contendo medicamentos diretamente nos corpos hídricos, cenário comumente visto em áreas urbanas.

Ainda de acordo com FENT *et al* (2005), quando esses compostos chegam às ETEs eles podem seguir dois caminhos para sua degradação: adsorção em partículas sólidas suspensas ou biodegradação, dependendo das características físico-químicas de cada molécula e se estão presentes principalmente na fase sólida ou líquida do efluente.

Alguns desses compostos apresentam características hidrofóbicas, ficando adsorvidos às partículas suspensas, como mencionado anteriormente e são removidos por sedimentação ou por algum outro método mecânico utilizado para a remoção de sólidos (RAIMUNDO, 2011). No entanto, nem todos os compostos são removidos de forma eficiente dos efluentes, pois essa eficiência depende da tecnologia utilizada na ETE e das condições climáticas. Como consequência, muitas vezes o destino final pra essas moléculas acaba sendo os corpos hídricos.

Assim como nas ETEs, as Estações de Tratamento de Água (ETA), nem sempre conseguem remover esses compostos completamente e por esse motivo, é possível encontrá-los, ainda que em baixas concentrações, mesmo em águas tratadas e disponibilizadas para o consumo (CLEUVERS, 2003).

Ainda de acordo com Fent *et al* (2005), os fármacos de uso veterinário podem chegar aos corpos hídricos após utilização do estrume como adubo e subsequente escoamento para os rios e lagos e também pela aplicação direta nas áreas utilizadas para aquicultura.

A presença desse tipo de composto na água potável é sinal de contaminação por efluentes e a sua detecção em baixas concentrações (na ordem de ng/L), requer métodos analíticos muito sensíveis e seletivos (Al-QAIM *et al*, 2015). Dentro desse contexto, o método mais utilizado em diversos estudos que desejam quantificar essas substâncias é a extração em fase sólida

(SPE), seguida de cromatografia em fase líquida com subsequente espectrometria de massas.

O comportamento e o destino dos fármacos quando atingem os corpos hídricos ainda não é muito bem conhecido, mas sabe-se que eles possuem baixa capacidade de volatilizar e por isso, sua dispersão se dá principalmente através do transporte pela água ou pela transferência ao longo da cadeia alimentar (FENT *et al*, 2005).

Aqueles que apresentam determinada relevância ambiental possuem as seguintes características: geralmente são produzidos em grande quantidade, têm certa atividade biológica e persistência no meio ambiente, principalmente após longos períodos de exposição (FENT *et al*, 2005). Justamente devido à essa capacidade de se manter no ambiente por um longo período, ou seja, meia vida alta e por serem compostos bastante estáveis, além de algumas outras características, essas substâncias possuem o potencial de serem bioacumuladas (SOUZA, 2011).

O problema dos fármacos é que eles são desenvolvidos para atuar no organismo dos humanos e dos animais em determinadas rotas metabólicas, destinados a moléculas alvo específicas, embora em alguns casos possam apresentar efeitos colaterais (FENT *et al*, 2005). Mas, quando estão no ambiente, eles são capazes de atingir organismos que nem sempre possuem os mesmos receptores (ou moléculas alvo) daqueles presentes nos indivíduos para os quais foram desenvolvidos, o que significa que a resposta que esses organismos irão apresentar ao entrar em contato com esses compostos, pode ser completamente diferente daquelas já esperadas.

Um dos maiores problemas que podem causar quando estão no ambiente aquático, é a capacidade de provocar efeitos genotóxicos, ou seja, alterações genéticas, nos organismos aos quais estão em contato (SOUZA, 2011). Esses efeitos podem ser verificados através da realização de testes ecotoxicológicos em laboratório. Dentre as diversas classes encontradas no mercado, uma das mais preocupantes do ponto de vista ambiental é a dos antibióticos, como o sulfametoxazol e o trimetropim, por exemplo. Quando esses compostos são descartados no ambiente, são capazes de provocar a indução de resistência de bactérias patogênicas aos antibióticos ou ainda efeitos genotóxicos em peixes, dentre outros (LIMA *et al*, 2017).

Os testes de toxicidade podem ser utilizados, entre outros objetivos, para investigar os efeitos dos fármacos e seguem as diretrizes estabelecidas por guias e normas orientadoras, tais como as estabelecidas pela EPA, OECD (*Organization for Economic Co-operation and Development*), ISO (*International Organization for Standardization*) e etc., e são normalmente aplicados em organismos tais como algas, zooplâncton, além de outros invertebrados aquáticos e peixes (FENT *et al*, 2005).

2.5. O Bisfenol-A no Meio Ambiente

O bisfenol-A é o principal composto pertencente à classe do Bisfenol, um grupo de difenilcanos muito utilizados na produção de plástico (GHISELLI & JARDIM, 2007) e que não ocorre naturalmente no meio ambiente (TSAI, 2006). É um monômero utilizado na indústria como aditivo plastificante (GOLOUBKOVA & SPRITZER, 2000; POJANA *et al*, 2004) para a produção de policarbonatos e outros polímeros (KRISHNAN *et al*, 1993), além de resinas epóxi e de poliestirenos insaturadas (GHISELLI & JARDIM, 2007).

Por ser um composto resistente e com uma boa flexibilidade, devido às suas propriedades moleculares, é muito utilizado em embalagens de produtos farmacêuticos, na fabricação de utensílios de plástico, como potes, garrafas de água e mamadeiras, dentre outros (GOLOUBKOVA & SPRITZER, 2000). Ele também pode ser utilizado no revestimento de latas de alimentos em conserva e de bebidas, graças à sua propriedade estabilizante (GHISELLI & JARDIM, 2007). Como consequência dessa ampla gama de utilização pelas indústrias, a demanda pelo BPA e seu consequente lançamento no ambiente tem aumentado (TSAI, 2006).

Esse composto pode ser liberado no meio ambiente após sofrer um processo de polimerização incompleta ou ainda após ser submetido às altas temperaturas, que são capazes de provocar sua hidrolização (GOLOUBKOVA & SPRITZER, 2000).

Devido à sua presença em diversos produtos de uso doméstico, é comum serem detectados em ETEs e em corpos hídricos receptores. Eles também podem ser lançados no ambiente através de fontes pontuais, provenientes do lançamento de efluentes da produção industrial, por fontes difusas, devido ao

processo de lixiviação dos seus produtos derivados, além de serem encontrados em lixiviados de aterros sanitários (SODRÉ *et al*, 2007).

Dentre todas as possíveis fontes de BPA no ambiente, a produção industrial é a maior responsável pela liberação desse composto, sendo sua produção anual superior a 5 milhões de toneladas (CHAVES, 2016). Só na Europa, a produção de papel contribui com aproximadamente 150 toneladas por ano e a produção de resinas epóxi e PVC contribui com 35 toneladas, aproximadamente (SODRÉ *et al*, 2007).

Embora apresente um elevado grau de solubilidade e o ambiente aquático seja o principal responsável por sua distribuição para os demais compartimentos ambientais, seu coeficiente de partição octanol-água (parâmetro utilizado para verificar a afinidade de um composto com a matéria orgânica) é Log Kow 3,4, indicando que o composto possui natureza hidrofóbica e que por isso, há uma maior probabilidade de ser encontrado adsorvido à matéria orgânica em suspensão, levando-a a ser encontrada também no solo e sedimento (GHISELLI & JARDIM, 2007; SODRÉ *et al*, 2007; RAIMUNDO, 2011).

Mesmo assim, sua remoção em estações de tratamento utilizando-se os processos convencionais de remoção de compostos orgânicos é reduzida (aproximadamente 59 %), devido à sua grande solubilidade em água, e por esse motivo, esse composto acaba sendo lançado no ambiente (SODRÉ *et al*, 2007). Ao chegar ao meio ambiente, o BPA pode ser degradado biologicamente, tendo uma meia-vida no solo variando entre 1 e 180 dias e na água entre 2,5 a 4 dias (GHISELLI & JARDIM, 2007).

Condições ambientais, tais como: temperatura, salinidade, pH, presença de material húmico ou particulado, dentre outros, também podem afetar a solubilidade e o destino dos compostos nos ecossistemas e como consequência, podem facilitar ou dificultar sua remoção do ambiente (RAIMUNDO, 2011).

O BPA é um composto bastante estudado devido à sua capacidade de provocar efeitos desreguladores no sistema endócrino dos seres vivos. Ele pode provocar interrupção nas atividades do hormônio da tireoide, pode alterar o desenvolvimento das glândulas mamárias e células germinativas, além de ser capaz de provocar anomalias nos cromossomos (CHAVES, 2016).

Estudos indicam que, após a realização de ensaios toxicológicos *in vitro*, foi possível constatar que o BPA possui uma capacidade de provocar DE de

1000 - 15000 vezes menor do que alguns hormônios, como o estriol, por exemplo, e de 4 a 6 vezes menos do que o E2 (GHISELLI & JARDIM, 2007).

No entanto, embora a Agência de Segurança Alimentar Europeia (EFSA) tenha estipulado $50 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ como limite para a dose diária, pesquisas revelaram que os efeitos de DE podem ser observados mesmo em doses inferiores (CHAVES, 2016).

Os seres humanos podem ingeri-lo através do consumo de alimentos enlatados ou armazenados em utensílios plásticos e também pela ingestão de água contaminada (CHAVES, 2016), já que sua remoção nas ETEs e ETAs não é muito eficiente e não é raro encontrá-lo, mesmo que em pequenas quantidades, nos corpos hídricos destinados ao abastecimento.

Devido a essa dificuldade de remoção dos micropoluentes nas ETEs e ETAs e sua conseqüente chegada aos corpos hídricos, os organismos aquáticos se tornam vulneráveis e podem ficar expostos ao longo de todo o ciclo de vida. Por causa dessa exposição contínua, é importante saber quais os possíveis efeitos que o BPA pode provocar sobre esses indivíduos.

Diversos estudos realizados com peixes mostram que o BPA pode provocar deformidades nos embriões, hemorragia e anormalidades no desenvolvimento em concentrações superiores a $100 \mu\text{g/l}$, além de inibir o crescimento dos machos, quando expostos por um longo período a concentrações variando entre 640 e $1280 \mu\text{g/l}$ de amostra (KANG *et al*, 2007). Ainda em peixes, foram encontradas anomalias cromossômicas utilizando-se a análise da frequência de micronúcleos de células sanguíneas para exposições a doses de $50\mu\text{g/kg}$ e uma diminuição no número de ovos produzidos (KANG *et al*, 2007). Ainda segundo Kang *et al* (2007), o BPA também interfere no sistema reprodutor de machos e fêmeas, provocando anomalias na produção de espermatozoides e no crescimento das gônadas, chegando a comprometer a ovulação mesmo em baixas concentrações ($5 \mu\text{g/l}$).

Assim como observado em peixes, o BPA pode provocar anomalias no desenvolvimento de embriões de sapos, estimular a feminização dos machos e interferir na produção de vitelogenina (KANG *et al*, 2007). Ele também pode se ligar aos hormônios $\text{TR}\alpha$ e $\text{TR}\beta$, importantes na metamorfose desses anfíbios, impedindo que se liguem e ativem o hormônio T3 (todos eles produzidos pela tireoide).

O BPA pode provocar efeitos adversos em invertebrados também, como por exemplo, em moluscos que vivem em ambientes aquáticos. Organismos da espécie *Potamopyrgus antipodarum*, expostos a 100 µg/l, tiveram a produção de embriões inibida, enquanto em indivíduos de *Hydra oligactis* foram estimulados a se reproduzirem assexuadamente quando expostos às concentrações da ordem de 1000 µg/l e *H. vulgaris* teve seu processo de regeneração inibido quando exposto às concentrações superiores a 460 µg/l (KANG *et al*, 2007).

Segundo Chaves (2016), estudos realizados com roedores demonstraram que o BPA foi capaz de aumentar a ação da enzima aromatase na próstata desses indivíduos e afetar a produção da 5α-redutase, responsável pelo metabolismo de esteroides. O BPA pode ainda se ligar ao receptor do E2 e apresentar assim, atividade anti-androgênica, levando ao surgimento de efeitos desreguladores (GOLOUBKOVA & SPRITZER, 2000; CHAVES, 2016). Sua presença na urina de homens expostos diariamente também foi correlacionada à baixa qualidade dos espermatozoides (ROCHESTER, 2013).

Nos seres humanos, a ingestão de água contaminada e o uso contínuo de utensílios domésticos contendo BPA podem levar ao surgimento de diversos distúrbios hormonais. No trabalho de Rochester (2013) são abordados vários estudos realizados em hospitais dos Estados Unidos, os quais correlacionam a presença de BPA no organismo de mulheres ao baixo potencial de fertilidade decorrente da baixa produção de E2. Além disso, a presença de BPA também foi correlacionada a problemas na implantação e na formação do embrião durante a gestação e na ocorrência de partos prematuros (ROCHESTER, 2013). Ele também foi encontrado no cordão umbilical de bebês gerados por mulheres expostas à substância.

2.6. Ensaio de Toxicidade para Ambientes Aquáticos

O monitoramento ambiental através de análises físico-químicas dos compartimentos ambientais, ou seja, da água, solo, sedimento ou ar, é limitado pela disponibilidade dos métodos de detecção e também pela incapacidade de previsão dos efeitos tóxicos de misturas complexas de compostos químicos (BOLOGNESI, 2011). Com isso, o uso de ensaios utilizando organismos bioindicadores, como forma de prever as alterações ecológicas e os efeitos

tóxicos provocados por esses compostos, vem se mostrando uma alternativa mais eficaz.

Os resultados obtidos através desses ensaios muitas vezes são aplicados nas avaliações de risco ecológico para compreender de que forma os compostos de interesse podem colocar em risco o meio ambiente. Por esse motivo, os resultados obtidos são baseados em ensaios realizados com organismos-chave para cada tipo de compartimento ambiental. Estes organismos devem ser sensíveis a esses compostos e possuírem uma ampla distribuição no ambiente (VERSTEEG *et al*, 1997).

Toxicidade é o termo utilizado para expressar a capacidade de determinada substância química provocar efeitos prejudiciais aos organismos ao entrar em contato com eles, podendo ter efeitos agudos ou crônicos (MOREIRA, 2014). Os efeitos agudos são observados em organismos que foram expostos às altas doses das substâncias de interesse por curtos períodos de tempo, que não abrangem todo o seu ciclo de vida e possui o objetivo de avaliar efeitos mais graves sobre os organismos, mesmo após curtos períodos de exposição, como morte. Já os efeitos crônicos são observados após longos períodos de exposição dos organismos às doses menores dessas substâncias, que englobam todo ou quase todo o seu ciclo de vida e tem o objetivo de avaliar os efeitos subletais que podem ser provocados nos indivíduos, como alterações na taxa de reprodução ou crescimento (BRESSOLA, 2007).

Os compostos químicos podem provocar uma série de reações quando em contato com os seres vivos, dependendo da sua concentração e da suscetibilidade do organismo e do ambiente em interagir com essa substância ou uma mistura de substâncias (REGINATTO, 1998). Em muitos casos, uma substância sozinha não é capaz de provocar efeitos tóxicos sobre a biota, mas quando interage com outras substâncias presentes no ambiente, pode produzir compostos derivados capazes de provocar danos ao ambiente (BRESSOLA, 2007; SALOMÃO *et al.*, 2014b).

Os efeitos tóxicos irão variar também entre organismos da mesma espécie e de níveis tróficos diferentes. Por isso, em ensaios de toxicidade são utilizados organismos de diferentes níveis tróficos e são feitas replicatas dos ensaios, a fim de se avaliar de forma mais ampla os efeitos que uma substância

ou um grupo de substâncias pode causar no meio ambiente (SALOMÃO *et al.*, 2014b).

2.7. Bioindicadores Utilizados para Avaliar a Ação dos Poluentes Aquáticos

São considerados organismos bioindicadores aqueles que sofrem alterações nas suas funções vitais (reprodução, alimentação, sobrevivência, etc.) mediante mudanças nas condições do ambiente como alterações no pH, temperatura, salinidade, dentre outros (BAPTISTA, 2001).

Diversos organismos podem ser utilizados em estudos de monitoramento ambiental para avaliação dos impactos provocados principalmente pelas atividades antrópicas. Para isso, podem ser classificados de três formas, dependendo do tipo de ensaio ao qual serão submetidos e da resposta que serão capazes de apresentar (RAYA-RODRIGUES, 2000 *apud* RODRIGUES, 2002):

- **Organismos indicadores:** são aqueles indivíduos ou comunidades de indivíduos que indicam as condições ambientais mediante a ocorrência de impactos, mas que não são capazes de expressar resultados quantitativos sobre os níveis de poluentes presentes no ambiente. Um exemplo são os peixes da Lagoa Rodrigo de Freitas.
- **Organismos teste:** são os indivíduos cultivados em laboratório com o objetivo de serem utilizados em ensaios ecotoxicológicos sob condições controladas a fim de se obter uma resposta quantitativa sobre o impacto ambiental esperado (ex.: algas, microcrustáceos e peixes).
- **Organismos monitores:** são os organismos nativos de um local ou introduzidos com a finalidade de avaliar os impactos ambientais tanto qualitativa quanto quantitativamente (ex.: peixes nativos ou em tanques rede e cordas de mexilhões).

Segundo Damato (2001) *in*: Indicadores Ambientais: Conceitos e Aplicações *apud* Mendes (2004), para a realização dos testes com organismos indicadores é importante verificar se:

- O organismo escolhido é representante de um grupo ecológico importante;
- É abundante e pode ser encontrado ao longo de todo o ano;
- Pode ser cultivado em laboratório;
- As exigências ambientais necessárias para o desenvolvimento da espécie são conhecidas;
- O efeito tóxico provocado no bioindicador é facilmente observado;
- A espécie escolhida é sensível às substâncias ou às condições ambientais às quais será submetida;
- Está presente na cadeia alimentar dos seres humanos.

No geral, para os ensaios de toxicidade em ambientes aquáticos, são utilizados indivíduos dos seguintes níveis tróficos: algas (produtores), microcrustáceos (consumidores primários), peixes (consumidores secundários) e bactérias (decompositores) (MOREIRA, 2014; SILVA, 2015).

2.7.1. Ensaio com *Oreochromis niloticus*

A aplicação de testes de genotoxicidade em organismos com potencial bioindicador possibilita a avaliação dos compostos com potencial de provocar mutações nos seres vivos e o rastreamento da fonte e do destino desses contaminantes (BOLOGNESI, 2011).

De acordo com Sanchez-Galan *et al* (1999), as espécies de peixes consideradas ideais para a realização de ensaios de genotoxicidade de determinados poluentes, devem atender aos seguintes critérios: possuir ampla distribuição em diferentes tipos de ecossistema; apresentar alta sensibilidade à presença dos poluentes, sendo capazes de emitir resposta mesmo em baixas concentrações; serem adequadas ao cultivo em laboratório e possuir uma população grande o suficiente na natureza, de modo que a captura de indivíduos para os ensaios em laboratório não comprometam seu estado de conservação.

Oreochromis niloticus é uma espécie de tilápia usualmente utilizada em bioensaios onde se deseja avaliar os efeitos genotóxicos de uma determinada amostra. Embora não seja natural do Brasil, a espécie se adaptou bem às

diferentes condições climáticas do país e por isso se tornou um organismo de fácil acesso para a realização de ensaios ecotoxicológicos (BÜCKER & CONCEIÇÃO, 2012).

Estudos indicam que essa é a espécie de ciclídeos mais cultivada no mundo, pois além de ser capaz de se adaptar às diferentes condições climáticas, possui boa resistência sob condições eurialinas, sobrevive mesmo mediante variações de temperatura consideráveis (8 °C às 42 °C) e ainda é capaz de suportar situações de estresse, se tornando, portanto, uma boa opção para a realização de ensaios para avaliação toxicológica (SALOMÃO & MARQUES, 2014a).

Os ensaios de genotoxicidade são normalmente aplicados utilizando-se essa espécie de ciclídeos devido, também, à sua sensibilidade e capacidade de apresentar respostas rápidas às variações ambientais. Dois tipos de ensaios de genotoxicidade que podem ser realizados são os testes de investigação de micronúcleos (MN) e o teste cometa, sendo o primeiro relatado em diversos estudos como o teste mais popular para esse tipo de análise.

O teste do MN vem sendo aplicado como índice de acúmulo de danos genéticos durante a vida útil das células é uma das técnicas mais adequadas para identificar a resposta integrada às misturas complexas de contaminantes encontrados nas amostras ambientais (BOLOGNESI, 2011).

Os micronúcleos são fragmentos de cromatina, com aparência de pequenos núcleos, que se formam graças à quebra de cromossomos durante a anáfase (KUMAR, 2012). Essas deformidades podem ocorrer naturalmente ou podem ocorrer por indução dos organismos à presença de poluentes, sendo dessa forma uma ferramenta para se avaliar a qualidade de uma amostra ambiental quanto à presença e efeito de poluentes (CHRISTOFOLETTI, 2008).

Embora esse teste possa ser realizado em diversos tipos de organismos, como moluscos bivalves, por exemplo, existe uma tendência na sua realização em ensaios *in vivo* com peixes, pois a presença de MN pode ser verificada em diferentes tipos celulares, como eritrócitos, células dos rins, células branquiais, hepáticas e presentes nas nadadeiras. Segundo Bolognesi (2011), entre todos esses grupos celulares, as células sanguíneas (eritrócitos) são as mais utilizadas, pois não requerem um preparo complexo e nem a morte do animal.

A investigação de MN em células de peixes é normalmente mais utilizada, pois eles possuem eritrócitos nucleados, o que facilita a análise visual, além de serem melhores indicadores da qualidade da água, já que a absorvem e acumulam os poluentes no organismo, podendo assim, transferi-los ao longo da cadeia trófica, até chegar ao ser humano através da alimentação.

2.7.2. Ensaio com *Raphidocelis subcapitata*

Microalgas são consideradas organismos ideais para a realização de ensaios ecotoxicológicos para a avaliação de impactos em ambientes aquáticos, uma vez que são produtores primários, essenciais na produção de oxigênio nos corpos hídricos e são a base alimentar de diversos organismos. Por isso, qualquer impacto que as afete, pode desencadear efeitos adversos ao longo de toda a cadeia trófica (KACZALA *et al*, 2011).

Elas também são bastante exploradas, pois, ensaios com algas são baratos, apresentam boa sensibilidade e respondem rapidamente às alterações ambientais, permitindo assim com que ações de controle da poluição sejam tomadas antes que impactos mais severos se estendam ao longo do ecossistema (PAVLIĆ *et al*, 2005).

Além disso, alguns problemas verificados em bioensaios realizados em animais que vivem em ambientes aquáticos, não ocorrem nos testes realizados em algas, como por exemplo: estresse provocado por baixos níveis de oxigênio dissolvido, toxicidade provocada pela presença de amônia, que acaba mascarando outras formas de toxicidade e mortalidade ou danos aos organismos-teste devido à presença de material particulado (ARENSBERG *et al*, 1995). Também há uma diminuição no número de peixes, crustáceos e indivíduos de outros grupos que seriam sacrificados após a realização dos testes (ARUOJA, 2011).

Os testes ecotoxicológicos utilizando algas como bioindicadores começaram a ser realizados na década de 50, para verificar a qualidade das águas superficiais em relação à eutrofização, mas somente a partir da década de 80 que os métodos utilizados atualmente foram padronizados (REGINATTO, 1998). Os resultados dos ensaios ecotoxicológicos com algas são parte dos dados básicos necessários para a avaliação dos impactos ambientais

provocados por determinados compostos químicos, conforme recomendado por instituições internacionais, como a OECD por exemplo. Ensaio com microalgas também fazem parte do controle necessário para a avaliação de impacto proveniente do lançamento de efluentes domésticos e industriais (ARUOJA, 2011).

Dentre eles, o mais comum é a avaliação da inibição do crescimento utilizando espécies cultivadas em laboratório, que são expostas normalmente por um período de dois a quatro dias às substâncias de interesse em meio enriquecido, enquanto crescem em luz contínua (HAILING - SØRENSEN *et al*, 1996).

Nos ensaios que avaliam a inibição do crescimento em microalgas, são verificados: abundância, taxa de crescimento e variação de biomassa em ensaios que duram entre 72 e 120 h (EXPÓSITO *et al*, 2017). Segundo Perin (2005) *apud* Hobold (2007), após o período de exposição, é realizada uma comparação com o teste controle para verificar se houve:

- Efeito tóxico agudo, ou seja, não houve crescimento da biomassa inicial ou esse crescimento foi insignificante;
- Inibição do crescimento, indicada pelo atraso no crescimento inicial da biomassa;
- Estímulo ao crescimento, ou seja, há um aumento da biomassa inicial inoculada na amostra.

Esse ensaio foi proposto pela *International Organization for Standardization* (ISO) em 1989, pela normativo nº 8692 e as espécies sugeridas para a realização dos ensaios são *Scenedesmus subspicatus* e *Selenastrum capricornutum*, atualmente conhecidas como *Desmodesmus subspicatus* e *Raphidocelis subcapitata*.

A escolha dos organismos utilizados para os ensaios ecotoxicológicos deve se basear, entre outros fatores, na sensibilidade do indivíduo aos componentes ou possíveis componentes presentes na amostra ambiental analisada, para que se possam observar os prováveis efeitos adversos que uma determinada substância pode provocar naquele grupo de organismos.

Ela varia de espécie para espécie devido às características morfológicas, citológicas, fisiológicas e genéticas dos indivíduos (ROJÍKOVÁ-PADRTOVÁ & MARSÁLEK, 1999). Por esse motivo, algumas espécies de alga são utilizadas

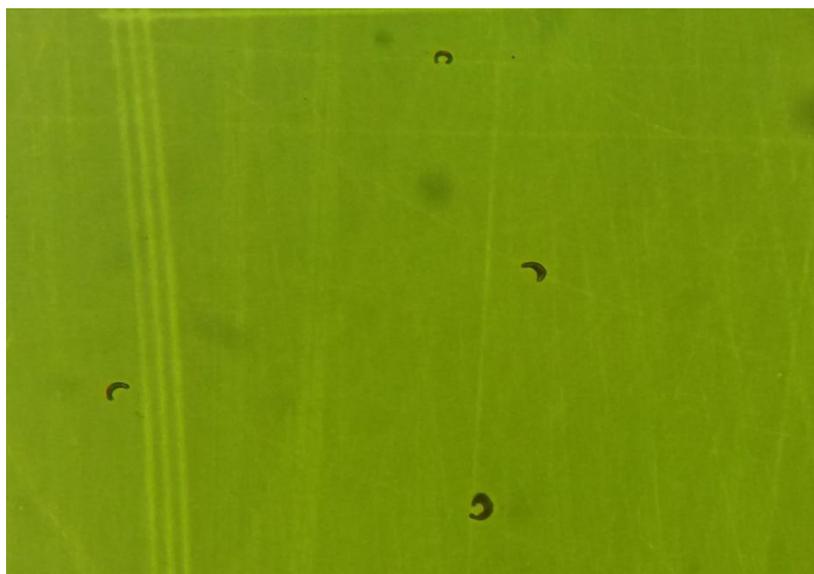
como modelos, destacando-se as espécies: *Raphidocelis subcapitata* e *Chlorella vulgaris*, por exemplo. Essas espécies são aconselháveis para a realização desses ensaios, pois são mais sensíveis do que invertebrados, peixes e outras espécies de algas para diversas substâncias. Além disso, possuem três características importantes (EXPÓSITO *et al*, 2017):

- Essas algas se apresentam como células unitárias que não formam agregados em condições de ensaio;
- São fáceis de manter em condições de laboratório;
- São muito sensíveis à presença de contaminantes.

R. subcapitata é uma espécie de *chlorophyta* unicelular cosmopolita, que ocorre em ambientes mesotróficos a eutróficos. Descrita em 1914 por Printz, inicialmente foi batizada como *Selenastrum capricornutum* e em 1953 foi rebatizada por Korschikov como *Kirshneriella subcapitata*. Em 1986, Nygaard *et al* a enquadraram no gênero *Raphidocelis* e até hoje, a espécie leva esse nome (ARUOJA, 2011).

Essas algas possuem corpo em formato de foice, como pode ser observado na figura 3, e é muito utilizada como bioindicadora em ensaios ecotoxicológicos devido, além dos motivos acima mencionados, à sua alta taxa de crescimento (YAMAGIASHI *et al*, 2017).

Figura 3: Células de *Raphidocelis subcapitata*.



No trabalho de Baun *et al* (1998) foram realizados bioensaios com *D. magna* e *R. subcapitata* para verificar qual grupo era mais sensível à presença de herbicidas e as microalgas se mostraram mais sensíveis (RODRIGUES, 2002). Em estudos realizados por Fairchild *et al* (1998), comparando a sensibilidade relativa de seis espécies de algas a herbicidas, *R. subcapitata* também se mostrou a espécie mais sensível, assim como foi verificado no trabalho de Rojíková-Padrťová & Marsálek (1999) ao compararem a sensibilidade de sete espécies de algas à presença de herbicidas e metais (RODRIGUES, 2002).

Devido à grande variação na sensibilidade observada para diferentes espécies de algas, a toxicidade verificada para uma espécie não pode ser extrapolada para outra e por esse motivo, a melhor solução é realizar testes com espécies representativas dos grupos mais importantes, embora o uso apenas de *R. subcapitata* se justifique legalmente por recomendação de órgãos ambientais reconhecidos internacionalmente (ARUOJA, 2011).

2.7.3. Ensaio YES com *Saccharomyces cerevisiae*

O ensaio YES é um ensaio realizado com cepas geneticamente modificadas da levedura *Saccharomyces cerevisiae* a fim de se detectar a possível atividade estrogênica de uma amostra ambiental. Para isso, é necessário que a amostra ambiental passe por uma extração de fase sólida, isto é, seja concentrada para que atinja o limite de detecção do método, uma vez que os DE encontram-se em concentrações muito baixas no ambiente (SILVA, 2015).

As células da levedura modificada receberam um fragmento de DNA humano contendo o receptor de estrogênio, através da indução da enzima Lac-Z. Dessa forma, ao interagir com compostos que possuam atividade estrogênica, o receptor humano introduzido irá se ligar ao composto e induzirá a expressão do ativador transcricional. Este, por sua vez, irá induzir a expressão da β -galactosidase, que será então liberada e degradará o substrato, transformando-o de chlorophenol red- β -D-galactopyranoside, de coloração tipicamente amarela em chlorophenol red, de coloração vermelha, alterando assim a cor do meio (SILVA, 2015).

Após o período de exposição, que normalmente é de 72 horas, é realizada a mensuração colorimétrica, ou seja, através da mudança de coloração do meio, saindo do amarelo para tons de vermelho, é realizada a leitura espectrofotométrica. Os resultados da leitura são comparados aos valores do controle positivo de 17 β -estradiol, de forma a se encontrar a concentração de equivalentes de estradiol (EQ – E2) presentes na amostra (ROUTLEDGE e SUMPTER, 1996 *apud* SILVA, 2015).

Diversos fatores podem influenciar nos resultados do ensaio, tais como a presença de substâncias voláteis e que podem ser transferidas de um poço da placa de amostragem para outro, o tempo de exposição da cepa à amostra, além da complexidade da amostra ambiental, que pode conter compostos que são tóxicos às leveduras e por isso podem inibir o seu crescimento durante o período de amostragem ou ainda matá-las. Dessa forma, torna-se importante ter um controle sobre esses fatores (SILVA, 2015).

Como os ensaios ecotoxicológicos são mais baratos do que os ensaios de avaliação química da amostra, o uso do ensaio YES é uma importante ferramenta para se evitar gastos desnecessários, pois pode servir de um indicador da qualidade e composição química da amostra, quanto à presença ou não de compostos DE nela e com isso nortear o pesquisador a quais amostras precisam ser mais detalhadamente caracterizadas, de acordo com as SQI (BRIX *et al*, 2010; SILVA, 2015).

2.7.4. Ensaio com *Ceriodaphnia dubia*

Uma ampla gama de organismos aquáticos é utilizada em testes ecotoxicológicos nas avaliações de risco, entre eles, os invertebrados aquáticos são utilizados com mais frequência (VERSTEEG *et al*, 1997). Cladóceros são pequenos crustáceos muito explorados nesses testes, pois são fáceis de obter, se adaptam bem às condições de laboratório, necessitam de pouco espaço para serem cultivados e representam um dos grupos mais sensíveis à presença de compostos químicos (MOUNT & NORBERG, 1984).

Além disso, desempenham um papel importante na cadeia trófica dos ambientes aquáticos, pois por serem consumidores primários (alimentam-se de bactérias e algas), atuam como ponte entre algas e os consumidores

secundários, como peixes, por exemplo (MARTINS, 2008), e se distribuem amplamente em ambientes dulciaquícolas (MENDES, 2002).

Daphnídeos, representantes dos gêneros *Daphnia* e *Ceriodaphnia*, por exemplo, são exemplos de cladóceros planctônicos filtradores normalmente utilizados como organismos-teste nos estudos toxicológicos de efluentes complexos (CERDA & OLIVE, 1993), devido à sua sensibilidade às alterações das condições ambientais, permitindo indicar o estado de saúde dos corpos hídricos.

Devido ao grande número de compostos químicos que precisam ter seus níveis de toxicidade estudados e seus possíveis impactos ambientais definidos, e devido ao custo associado à realização desses estudos, existe no meio acadêmico uma grande necessidade de otimização dos ensaios ecotoxicológicos para evitar o desperdício de tempo e recursos (WINNER, 1988).

Embora tradicionalmente os testes fossem realizados com *Daphnia*, a *Ceriodaphnia* começou a ser mais explorada a partir dos anos 80, devido à sua resposta mais rápida aos estresses, necessitando de testes de apenas 7 dias, enquanto os testes com *Daphnia* necessitavam de 21 dias para observação dos efeitos adversos. Além disso, *C. dubia* (figura 4) é igualmente ou ainda mais sensível ao contato com compostos químicos do que *D. magna* e os testes realizados com ela apresentam resultados similares aos resultados obtidos com *Daphnia*, gastando apenas um terço do tempo de ensaio (WINNER, 1988).

Figura 4: *Ceriodaphnia dubia* utilizada em ensaios ecotoxicológicos. Fonte: Pakrashi *et al*, 2013.



Schroder e colaboradores (2008), por exemplo, estudaram os efeitos tóxicos de efluentes municipais utilizando como bioindicadores as duas espécies citadas e obtiveram 100 % de mortalidade em *C. dubia*, enquanto *D. magna* se mostrou menos sensível à amostra analisada, indicando que em um ambiente natural, *C. dubia* poderia ser mais facilmente afetada a menores alterações nas condições físico-químicas, assim como outras espécies tão ou mais sensíveis. Por esse motivo, é importante realizar os ensaios toxicológicos com os organismos mais sensíveis que representem determinado nível trófico.

De uma forma geral, o teste realizado com *Ceriodaphnia* consiste em acompanhar diariamente, ao longo de uma semana, o desenvolvimento de uma população de organismos. Para isso, um número conhecido de indivíduos com 24 h de idade é introduzido na amostra ambiental a ser analisada e a cada dia são verificadas as taxas de natalidade e sobrevivência (MASTERS *et al*, 1991). Esse teste foi proposto em 1984 por Mount & Norberg e abriu espaço para a realização de novas pesquisas para aprimorar a metodologia.

Alguns estudos, como o realizado por Masters *et al* (1991) e Oris *et al* (1990), indicam que os testes de toxicidade utilizando *C. dubia* podem ser realizados em um período de 4 dias ao invés de 7, desde que sejam utilizados organismos adultos no lugar dos juvenis (recém-nascidos), sem que haja

prejuízos nos resultados finais. Isso possibilita uma redução no tempo e nos custos para a realização dos ensaios.

Os testes com *Ceriodaphnia* também ganharam atenção, pois esse organismo pode ser utilizado para ensaios de toxicidade aguda e crônica e também devido à sua facilidade de cultura em laboratório e ao seu ciclo de vida reprodutivo relativamente curto, o que facilita a realização de testes com compostos química e biologicamente instáveis, além de permitir o monitoramento ambiental de efluentes (VERSTEEG *et al*, 1997). Ainda de acordo com Vertseeg e colaboradores (1996), essa redução do tempo necessário para a realização dos testes permite com que haja redução dos gastos de outros recursos, permitindo com que sobrem para a exploração de outros dados toxicológicos.

Quanto à ocorrência na natureza, esse gênero pode ser encontrado em corpos hídricos pequenos, como lagoas e valas ou em zonas costeiras de lagos e rios, mas a maioria dos membros habita corpos hídricos levemente eutrofizados (VERSTEEG *et al*, 1997). A espécie *Ceriodaphnia dubia* é uma representante exótica que foi introduzida no Brasil como organismo-teste para ensaios ecotoxicológicos (ABREU *et al*, 2010).

2.8. Legislações Reguladoras dos Poluentes em Ambientes Aquáticos

Até a década de 50, não existiam leis que regulassem os padrões de qualidade dos corpos hídricos, nem no Brasil e nem no mundo. Somente a partir desse período é que começaram a surgir os primeiros critérios, implementados pelos Estados Unidos e pela Rússia, que visavam proteger a vida nos ambientes aquáticos (ABRAHÃO, 2006). Essas leis, normas e regulamentos possuem o objetivo de tratar o problema na sua origem e assim evitar maiores impactos ambientais decorrentes da poluição dos corpos hídricos.

No Brasil o processo foi um pouco mais lento e apenas no ano de 1976 foram criados os primeiros padrões de potabilidade, visando o consumo humano (BERTOLETTI, 2001 *apud* ABRAHÃO, 2006). Ainda no Brasil, no ano de 1986, foi criada a Resolução CONAMA nº 20, com concentrações limites de lançamento para alguns parâmetros físico-químicos e para a classificação dos corpos hídricos, mediante os seus diferentes usos. Essa resolução foi revogada

em 2005 pela Resolução Conama nº 357, que em 2011 foi complementada pela CONAMA nº 430, que também trata dos padrões de lançamento de efluentes nos ambientes aquáticos, de acordo com a classe do corpo receptor.

Todas essas legislações visam adequar os lançamentos de compostos química de acordo com os tipos de uso previstos para os corpos receptores e embora no Brasil existam duas resoluções federais e algumas normas, resoluções e decretos estaduais tratando do lançamento de efluentes, muitos compostos presentes nos descartes industriais e domésticos ainda não possuem seus limites máximos permitidos estabelecidos. Por esse motivo, muitas vezes torna-se necessário recorrer ao uso dos limites previstos em instrumentos legais de outros países.

Essa falta de informações sobre os limites máximos permitidos para determinados compostos nos corpos hídricos coloca em risco o equilíbrio ecológico desses ecossistemas, já que não se conhecem os efeitos que esses elementos podem provocar sobre a biota.

Mediante as considerações expostas acima, as avaliações ambientais se tornam ferramentas importantes para a gestão dos recursos hídricos, pois permitem verificar sua qualidade ambiental com base nos limites previstos para cada composto, a fim de garantir que os tipos de uso determinados para aquele corpo hídrico sejam atendidos (LEITE, 2004). Essas avaliações também são importantes caso haja um histórico de contaminação que se queira acompanhar como evolui, além de indicarem áreas prioritárias para a aplicação de projetos de recuperação ambiental.

2.9. Modelo da Tríade Holandesa na Avaliação de Risco Ecológico

Avaliação de Risco Ecológico (ARE) é o conjunto de estudos que visam avaliar os efeitos ecológicos provocados pelas atividades antrópicas, como por exemplo: a presença de substâncias tóxicas nos ambientes aquáticos, no ar ou solos, a lixiviação em áreas contaminadas por chorume ou por metais, além das emissões de efluentes tanto de origem industrial quanto de origem doméstica (SANCHEZ, 2012). São, portanto, uma forma de avaliar o quão sustentável encontra-se um ecossistema, sendo capaz de descrever de forma qualitativa ou

quantitativa a ocorrência de possíveis alterações ambientais adversas (KOLLURU & BROOKS, 1998).

Além disso, estes estudos constituem uma ferramenta que auxilia durante a gestão de áreas poluídas, pois permitem avaliar quais são os riscos para os elementos ecológicos envolvidos e afetados por aqueles contaminantes ambientais (RODRIGUES & RODRIGUEZ, 2012). Este estudo ainda permite avaliar os riscos à saúde humana mediante a exposição a determinados contaminantes. Com a caracterização do risco, o pesquisador é capaz de compreender a relação existente entre os estressores, os efeitos ecológicos que provocam e os efeitos ambientais e assim atuar de forma a mitigar os prováveis danos ao meio ambiente (TALLINI, 2010).

O estudo de uma ARE pode ser dividido em quatro etapas. A primeira etapa é caracterizada pela formulação do problema, onde são levantados os dados sobre a área de estudo e sobre os contaminantes a serem investigados. Nesta etapa ainda é construído o modelo conceitual da área, onde se estabelece a relação entre as vias de exposição ambiental ao estressor e a cadeia de agentes receptores que serão possivelmente alcançados. Sendo assim, é possível determinar quais organismos estão mais vulneráveis e necessitam de maior atenção (TALLINI, 2010).

Na segunda etapa é feita a caracterização da exposição ambiental que está sendo avaliada. A terceira etapa visa caracterizar os efeitos ecológicos provocados por essa exposição. Na quarta etapa é realizada a caracterização dos riscos envolvidos. Dependendo do diagnóstico da situação, pode-se realizar uma quinta e última etapa, na qual serão definidos os critérios de decisão para gerenciamento do problema encontrado (RODRIGUES & RODRIGUEZ, 2012). A realização do estudo em etapas permite uma melhor identificação do problema e a tomada de decisões mais eficazes para solucioná-lo (TALLINI, 2010).

A avaliação de risco em etapas é recomendada principalmente pela relação de custo-benefício. Caso não seja detectado nenhum problema ou não haja nenhuma inconsistência nos dados obtidos em cada uma das etapas, pode-se prosseguir para as etapas seguintes e as medidas que forem necessárias

podem ser tomadas, sem o risco de gastos desnecessários de recursos na avaliação do risco (MENDES, 2016).

A ARE é necessária quando se desconfia que determinada ação possa trazer consequências desagradáveis ao meio ambiente ou para determinado componente ambiental que se deseja proteger. Sendo assim, o objetivo geral da ARE é transformar dados de pesquisa, considerados meramente científicos, em dados que possam ser mais facilmente interpretados e que reflitam os riscos de determinada atividade humana sobre o meio ambiente (GOMES, 2013).

Ainda segundo Gomes (2013), não é uma tarefa fácil estabelecer os parâmetros que precisam ser avaliados em relação aos fatores de estresse aos quais o ambiente está exposto. Visto que, sistemas ecológicos possuem uma ampla diversidade e complexidade dos seus componentes biológicos. Além disso, o risco ambiental de cada agente estressor irá variar de acordo com a sua natureza e capacidade de interação com o ecossistema (CAMPOS, 2017). De qualquer forma, esses componentes estão interligados pela cadeia trófica e os efeitos que incidirem sobre um, podem afetar vários níveis ao longo da cadeia, afetando todo ecossistema.

Os estudos que envolvem a ARE no Brasil ainda não possuem um protocolo normatizado. Isso faz com que cada pesquisador proponha e desenvolva seu próprio modelo de estudo. Geralmente esses modelos são baseados em legislações e modelos internacionais. Os modelos internacionais ressaltam que a etapa de ensaio ecotoxicológico aliada à quantificação química dos contaminantes, é fundamental para o sucesso do estudo de avaliação. Visto que elas poderão indicar quais interações poderão ocorrer entre os contaminantes biodisponíveis e os organismos expostos (NIEMEYER, 2007; TALLINI, 2010).

A Tríade Holandesa, ou *Sediment Quality Triad* (SQT), é uma metodologia da ARE que inicialmente foi criada para investigar possíveis contaminações em sedimentos (LONG & CHAPMAN, 1985). No entanto, vem sendo utilizada em diversos trabalhos para realizar a ARE em outros compartimentos ambientais (MENDES, 2016). Ela consiste de um estudo baseado em uma série de análises químicas, ecológicas e ecotoxicológicas, para avaliar os efeitos causados nos

organismos vivos após períodos de exposição a determinados agentes, que irão compor as linhas de evidência (LoE) química, ecológica e ecotoxicológica, respectivamente (MENDES, 2016).

A linha de evidência (LoE) química auxilia na avaliação da qualidade do corpo hídrico estudado, indicando quais substâncias orgânicas e inorgânicas estão presentes e as concentrações encontradas. Assim como as variações químicas que ocorreram em um ambiente ao longo do período do estudo. Isso permite uma melhor compreensão da dinâmica de contaminação do local. Dessa forma, é possível comparar os valores encontrados nas diferentes matrizes ambientais, com os limites máximos permitidos por Lei. Isso possibilita avaliar se essas substâncias estão dentro ou acima dos limites aceitáveis na Legislação de cada região ou País.

As LoE ecológica e ecotoxicológica consistem respectivamente no biomonitoramento *in situ* (biomonitoramento ativo); e no biomonitoramento em condições laboratoriais (biomonitoramento passivo), realizado através de testes crônicos e/ou agudos com organismos-teste padronizados ou nativos pertencentes a diversos níveis tróficos (TALLINI, 2010; MENDES, 2016). Ambas LoE indicam a resposta dos organismos à dinâmica do ambiente (*in situ* ou em laboratório) em que vivem, já que estes devem ser sensíveis às variações ambientais.

Ao longo dos anos com o avanço nos estudos da ARE, as LoE química e ecotoxicológica não sofreram alterações, no entanto, a LoE ecológica foi adaptada para avaliar alterações na comunidade aquática mais amplamente, já que se baseava apenas na análise de alterações nos organismos bentônicos (CHAPMAN, 1996).

Em 2006, Chapman e Hollert propuseram algumas análises para substituírem o estudo inicialmente realizado na LoE Ecológica em sedimentos, dentre as quais:

- a. Teste de histopatologia em peixes;
- b. Ensaio de toxicidade *in situ*;
- c. Ensaio para avaliar o potencial de genotoxicidade e desregulação endócrina da amostra, etc.

Para o cálculo de cada uma das LoE, os resultados obtidos em cada LoE são traduzidos de forma quantitativa, em escalas que normalmente variam de 0 a 1, onde 0 corresponde ao risco mínimo e 1 corresponde ao risco máximo observado para determinado componente. Essa gradação em níveis de risco permite a identificação das áreas mais afetadas e de como a contaminação se distribui ao longo dos pontos amostrais, permitindo também um melhor mapeamento da área afetada (MENDES, 2016).

Para cada uma dessas LoE, pode-se aplicar um peso, chamado de *weight of evidence* (WoE), que segundo Chapman (2002), pode ser definido como uma determinação relacionada aos possíveis impactos ecológicos baseados em múltiplas LoE. Ainda segundo o autor, o uso de WoE normalmente envolve comparações com áreas de referência, ou seja, aquelas que possivelmente não estão sob ação do impacto ambiental investigado.

O uso de WoE na ARE permite uma maior congruência nos dados obtidos, o que geralmente resulta em uma melhor tomada de decisões do que simplesmente o uso de LoE, pois o uso dos pesos permite que se alcance tanto a possibilidade de ocorrência do impacto, ou seja, o perigo de ocorrência, quanto à probabilidade que esse impacto ocorra, ou seja, o risco (CHAPMAN, 2002; SAMPLE *et al.*, 2014).

Jensen e Mesman (2006) ressaltam que, a aplicação diferencial dos pesos aos parâmetros pode ser aplicada pelos seguintes motivos:

- a. Pesos diferenciados podem ser aplicados para alguns parâmetros com base em considerações ecológicas, que devem ser definidas na etapa de construção do mapa conceitual, que é a base da ARE. Isso permitirá uma atenção especial para grupos específicos de indivíduos, como espécies-chave ou ameaçadas, por exemplo.
- b. Eles também podem ser aplicados para contabilizar o grau de incerteza ou de variação dentro dos *endpoints* trabalhados. Dessa forma, testes que apresentem um alto grau de incerteza ou de variação nos resultados, devem receber um peso menor.

- c. Por último, vários bioensaios não são capazes de demonstrar efeitos ecológicos condizentes com a realidade devido à dinâmica do ecossistema, embora estes estejam ocorrendo. Dessa forma, a aplicação de pesos diferenciados pode corrigir esses efeitos medidos e calculados.

Através dos resultados das avaliações dessas LoE e da aplicação dos seus respectivos pesos, é possível definir áreas prioritárias para a aplicação de políticas públicas de descontaminação. Como previsto no parágrafo 1º do artigo 27 da Resolução CONAMA nº 420, de 28 de dezembro de 2009, que diz:

“Nas situações em que a existência de determinada AI (área contaminada sob investigação) ou ACI (área contaminada sob intervenção) possa implicar em impactos significativos aos recursos ambientais, o gerenciamento do risco poderá se basear nos resultados de uma avaliação de risco ecológico, a critério do órgão ambiental competente.”

Sendo assim, a ARE é considerada como uma importante ferramenta de análise que permite identificar de forma mais clara e estimar com um maior grau de certeza as consequências ecológicas de um evento de contaminação, para que possam ser tomadas as medidas cabíveis de remediação e/ou gerenciamento.

3. METODOLOGIA

Os ensaios de ecotoxicidade, cromatografia e as análises físico-químicas foram realizados no Laboratório de Biorremediação, Fitotecnologias e Inovação no Tratamento de Águas e Efluentes (LABIFI) da UERJ.

Quatro coletas de amostragem foram realizadas nos meses de março, maio, julho e setembro de 2017, respeitando as seguintes etapas: coleta das amostras de água superficial ao longo da sub-bacia do rio João Mendes; análise físico-química das amostras em campo e no laboratório; ensaios ecotoxicológicos com as espécies *Ceriodaphnia dubia* (microcrustáceo), *Raphidocelis subcapitata* (microalga), *Oreochromis niloticus* (peixe) e *Saccharomyces cerevisiae* (levedura); e análises cromatográficas em UPLC (*Ultra Performance Liquid Chromatography*) para quantificação das substâncias químicas de Interesse (SQI).

3.1. Área de Estudo

A Bacia Hidrográfica do Rio João Mendes (sub-bacia) está localizada entre as latitudes 22°55' e 22°57'30"S e as longitudes 43°03'45" e 43°00'00"W (Galvão, 2008). Com área aproximada de 17 km², ela compreende cinco dos onze bairros da RO, sendo eles: Engenho do Mato, Itaipu, Maravista, Santo Antônio e Serra Grande, além do bairro de Várzea das Moças, localizado na região leste do município.

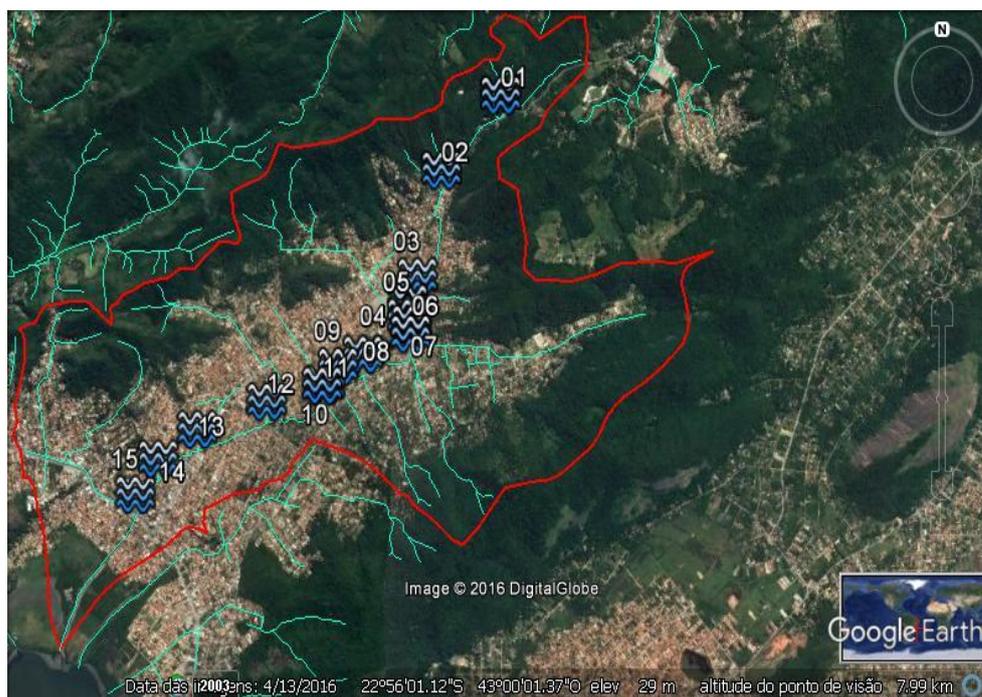
O clima da região é considerado tropical e subtropical, com condições de alta umidade, deixando a região com ar quente e úmido, típico do litoral do Rio de Janeiro (EIA, 2014). Os maiores índices pluviométricos ocorrem no verão, entre os meses de dezembro e fevereiro, com período de seca no inverno.

Figura 5: Mapas do Brasil, do Rio de Janeiro e de Niterói, com destaque para a Região Oceânica, na qual está localizada a Sub-Bacia do Rio João Mendes. Fonte: Google.



O rio de curso principal, que dá nome à bacia, nasce na Serra do Malheiro, no bairro de Várzea das Moças e possui aproximadamente 7 km de extensão até chegar à sua foz, na Lagoa de Itaipu (Figura 6). Nesse caminho, ele recebe a contribuição de efluentes domésticos de diversas residências, localizadas principalmente na sua Faixa Marginal de Proteção, e das águas de 15 afluentes.

Figura 6: Localização dos afluentes e delimitação da Sub-Bacia Hidrográfica do Rio João Mendes, Niterói – RJ, Brasil. Fonte: Base de dados da Prefeitura Municipal de Niterói.



3.2. Amostragem

As amostras de água superficial foram coletadas em 4 pontos amostrais (figuras 7 e 8), distribuídos ao longo da sub-bacia do Rio João Mendes. A seleção dos pontos amostrais foi realizada considerando a extensão total do rio principal (nascente e foz), contribuição dos afluentes ao rio principal, grau de contaminação e facilidade de acesso e segurança pessoal para coleta.

Figura 7: Pontos amostrais P_0 e P_1 selecionados na sub-bacia do Rio João Mendes, Niterói – RJ, para a realização da Avaliação de Risco Ecológico.



O ponto de referência do estudo foi o Ponto Zero (P_0), (Figura 7). Este ponto foi utilizado como ponto controle para os ensaios de ecotoxicidade e análises químicas (parâmetros físico-químico e cromatografia) em relação aos outros pontos coletados. Este ponto ficava próximo a nascente do rio João Mendes e foi selecionado devido às condições aparentes do local de preservação da mata do entorno, e sem a presença de construções (mais isolado da área urbana). Este local de coleta foi selecionado, pois apresentava as mesmas características, condições ambientais e climáticas dos demais pontos amostrais, e também por acreditarmos que estaria o mais livre possível do lançamento de efluentes domésticos.

Já os pontos P_1 , P_2 e P_3 , localizados à jusante do P_0 (todos georeferenciados abaixo), foram distribuídos ao longo do rio até a foz, respeitando os critérios já estabelecidos e localizados em áreas densamente urbanizadas, com interferência humana direta e lançamento de efluentes domésticos aparente (Figura 7 e 8).

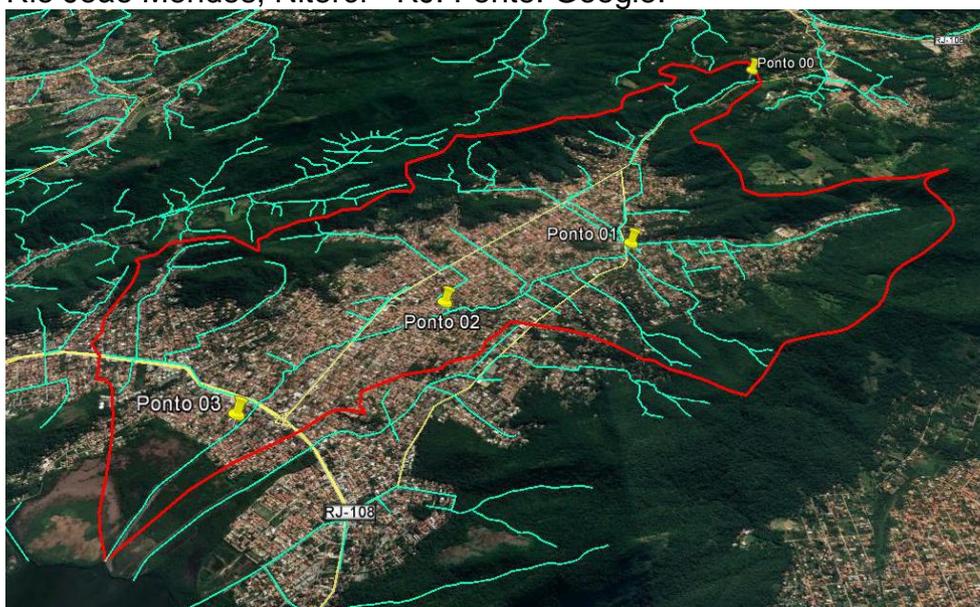
Tabela 1: Coordenadas geográficas dos pontos amostrais P_0 , P_1 , P_2 e P_3 .

Ponto Amostral	Latitude	Longitude
P0	22°54'45" S	42°59'42" O
P1	22°56'2.31" S	43° 0'31.51" O
P2	22°56'19.68" S	43° 1'19.9" O
P3	22°56'47" S	43°2'5" O

Figura 8: Pontos amostrais P₂ e P₃ selecionados na sub-bacia do Rio João Mendes, Niterói – RJ, para a realização da Avaliação de Risco Ecológico.



Figura 9: Distribuição dos pontos de coleta ao longo da sub-bacia do Rio João Mendes, Niterói - RJ. Fonte: Google.



As amostras foram coletadas em frascos de 1L de material plástico inerte polietileno de alta densidade (PEAD). Adicionalmente foram realizadas amostras controle do frasco de coleta com água ultrapura (Mili-Q[®]) e analisados por cromatografia líquida para a verificação da influência do mesmo nos resultados.

Para cada ponto amostral foram coletados 15 L de amostra, além de 500 mL de amostra em frasco de vidro para as análises de Carbono Orgânico Total (COT).

As amostras foram coletadas e preservadas de acordo com o Guia Nacional de Coleta e Preservação de Amostras (ANA, 2011) e a ABNT NBR 15469:2007 (ABNT, 2007).

3.3. Análises Referentes aos Parâmetros Físico-Químicos

Os parâmetros físico-químicos analisados em laboratório seguiram os métodos descritos pela *American Public Health Association* (APHA, 2012): Sólidos Totais (ST), Sólidos Totais Fixos (STF), Sólidos Totais Voláteis (STV) e Sólidos Suspensos Totais (SST), método 2540 Solids de B a F; Demanda Química de Oxigênio (DQO), método 5220 D; Carbono Orgânico Total (COT), método 5310; Fósforo Total, kit de análise da marca Hach modelos TNT 843 e 844 (aprovados pela USEPA); Nitrato (NO_3^-) método 4500- NO_3^- ; e Nitrogênio Amoniacal (NH_3) método 4500- NH_3 .

Os parâmetros físico-químicos analisados em campo, no momento da coleta, foram realizados com o auxílio da Sonda Multiparâmetro Horiba – modelo U-50 (figura 7): Potencial Hidrogeniônico (pH), Oxigênio Dissolvido (OD), Sólidos Dissolvidos Totais (SDT), Condutividade elétrica (CE), Turbidez, Temperatura do líquido e Potencial de Oxirredução (ORP).

Figura 10: Sonda multiparâmetros marca Horiba, utilizado nas análises físico-químicas realizadas em campo.



Em ambos os casos (em campo e laboratório), foram seguidos os procedimentos previstos na ABNT NBR 9897:1987.

Os valores encontrados para cada parâmetro nos pontos P₁, P₂ e P₃ foram comparados aos valores obtidos para o ponto P₀, utilizado como referência, com o objetivo de verificar sua ocorrência natural e calcular o risco químico para a área.

Além disso, cabe ressaltar que embora o Rio João Mendes não esteja oficialmente classificado de acordo com as classes da Resolução CONAMA nº 357 de 2005, os valores encontrados para cada parâmetro físico-químico (apêndices B, C, D e E) das amostras ambientais dos pontos P₀, P₁, P₂ e P₃ foram comparados aos valores máximos permitidos para corpos hídricos de água doce classe 2, conforme previsto no Art. 42 da mesma Resolução. Essa classe se destina aos seguintes usos:

- Ao abastecimento para consumo humano, após tratamento convencional;
- À proteção das comunidades aquáticas;
- À recreação de contato primário, tais como natação, esqui aquático e mergulho, conforme Resolução CONAMA nº 274, de 2000;
- À irrigação de hortaliças, plantas frutíferas e de parques, jardins, campos de esporte e lazer, com os quais o público possa vir a ter contato direto;
- À aquicultura e à atividade de pesca.

3.4. Análises Referentes à Linha de Evidência (LoE) Química

3.4.1. Ensaios em amostras de água superficial

As análises da linha de evidência química consistiram nas análises cromatográficas para quantificação das substâncias químicas de interesse (SQI), que foram: 1) 17 α etinilestradiol (EE2, CAS: 57-63-6), 2) Bisfenol A (BPA, CAS: 80-05-7), 3) Ibuprofeno (CAS:15687-27-1), 4) Trimetropim (CAS:738-70-5) e 5) Sulfametoxazol (CAS:723-46-6). Essas substâncias foram detectadas e quantificadas no Laboratório de Biorremediação e Fitotecnologias – LABIFI em um equipamento de Cromatografia Líquida de Ultra Performance UPLC-MS-MS TQD® XEVO (Waters) (Figura 11), com coluna Acquity UPLC BEH C18 (100 x 2,1 mm: 1,7 μ m, Waters) a 40°C. A fase móvel utilizada foi composta por

metanol e água com 0,01 % de ácido fórmico e 1 mM de acetato de amônio em gradiente linear.

Figura 11: Equipamento de Cromatografia Líquida de Ultra Performance UPLC-MS-MS TQD® XEVO (Waters) utilizado para a quantificação das substâncias químicas de interesse.



As amostras a serem analisadas foram preparadas seguindo as seguintes etapas: filtração em membranas de fibra de vidro de 1,2 μm e 0,2-0,6 μm ; extração em fase sólida (EFS) das amostras; eluição do cartucho e filtração das amostras em filtro de seringa 0,22 μm de PTFE (Politetrafluoretileno), para posteriormente ser realizada a injeção no cromatógrafo, conforme descrito nos itens abaixo:

a. Filtração das amostras em membranas:

500 mL de cada uma das amostras foram filtrados logo que chegaram ao laboratório e após a filtração foram mantidas refrigeradas 4 °C por 12 h, até a extração em fase sólida (EFS). A filtração foi realizada à vácuo, com auxílio de uma membrana de fibra de vidro de 1,2 μm , seguida por outra de 0,2-0,6 μm , ambas da Merck Millipore. Cada amostra filtrada foi armazenada em um frasco âmbar de 1 L previamente rinsado com água Milli-Q®.

b. Extração em fase sólida (EFS) das amostras:

Antes da extração, as amostras foram retiradas da geladeira (4°C) e deixadas sobre a bancada até que atingissem temperatura ambiente. Em seguida, o pH de cada amostra foi verificado com auxílio de um pHmetro de bancada e ajustado para 2, com solução de HCl 3 M (grau P.A.) preparada com água Milli-Q®.

As extrações em fase sólida (EFS) foram realizadas em capelas de exaustão seguindo o protocolo estabelecido no LABIFI em 4 etapas. As amostras foram extraídas em cartucho BondElut® C18 (500 mg, 3 mL) em duplicata. O processo foi realizado em Manifold com capacidade para 12 cartuchos, da Agilent Technologies®.

Etapa 1: Condicionamento do cartucho

Para o condicionamento do cartucho, foram percolados os seguintes solventes com o auxílio da bomba à vácuo com fluxo de aproximadamente 3 mL/min (gotejamento), tomando-se o cuidado de não deixar a fase sólida do cartucho seca entre um solvente e outro:

- 3x2 mL de Hexano;
- 1x2 mL de acetona;
- 3x6 mL de metanol;
- 5x2 mL de Água Milli-Q® em pH 3 (ajustado com solução de HCl 3 M grau P.A.).

2ª Etapa: Passagem da amostra pelo cartucho

500 mL de amostra foram percolados à vácuo em cartucho com fluxo de aproximadamente 3 mL/min (mantendo o gotejamento), tomando-se o mesmo cuidado da etapa 1 para que a fase sólida não secasse.

3ª Etapa: Armazenamento dos cartuchos

Os cartuchos preparados foram embalados individualmente e armazenados em freezer com temperatura de aproximadamente -20 °C.

4ª Etapa: Eluição dos analitos do cartucho

Os analitos foram eluídos do cartucho utilizando-se 4 mL de metanol e então, foram acondicionados em frascos âmbar de 10 mL sob efeito da gravidade. Em seguida, foi utilizada a bomba à vácuo por aproximadamente 5 minutos para completa secagem do cartucho.

c. Filtração da amostra eluída em filtro seringa:

Após a extração, a amostra eluída (em 4 mL de metanol) foi filtrada com seringa de vidro de 10 mL, utilizando-se membrana de seringa do tipo PTFE (Politetrafluoretileno) IC Millex LG[®] da Merck de 0,22 µm, sendo 2 mL armazenados para análise cromatográfica e 2 mL para o ensaio YES.

d. Injeção das amostras no UPLC:

Os compostos-alvo foram identificados e quantificados por cromatografia líquida de ultra eficiência, utilizando o sistema Waters ACQUITY[®], acoplado ao espectrômetro de massas tipo *in tandem*, modelo Xevo TQD[®], triplo quadrupolo (Waters, MA, USA), instalado no LABIFI-UERJ. O equipamento de UPLC utilizado possui sistema quaternário de gerenciamento de solvente (até 4 solventes) e sistema automatizado de injeção (*auto sampler*).

As análises cromatográficas das SQI foram realizadas com coluna de fase reversa (AQUITY UPLC[®] BEH C18, 1,7 µm, 2,1 x 50 mm; Waters, MA, USA) a 50°C, com fluxo de 0,4 mL/min., com A=água e B=metanol como fases móveis, ambas com 0.01 % hidróxido de amônio.

O volume de injeção foi de 5 µL, com tempo de corrida de 8 min., em modo gradiente, com condição inicial 98 % A até 4 min. Em seguida, a condição inicial foi reduzida para 1 % A até 5 min., e finalmente retornando e mantendo-se no estado inicial até o final da corrida, de acordo com metodologia implantada no LABIFI.

O detector de massas com fonte de *electrospray* (ESI) foi operado em modo positivo e negativo com monitoramento de reações múltiplas (MRM). A voltagem capilar foi de 3,2 kV (ESI+) e 3,2 kV (ESI-). A temperatura da fonte e de dessolvatação foram de 150 °C e 600 °C, respectivamente. O N₂ foi usado como gás de cone e de dessolvatação (200 e 800 L/h, respectivamente). O gás

Argônio foi usado como gás de colisão no MS/MS (0,15 mL/min.). Para cada analito, duas transições (confirmação e quantificação) foram utilizadas para identificação, de acordo com uma voltagem de cone e uma energia de colisão, otimizadas para máxima intensidade. Os parâmetros do detector estão listados na tabela 2. Os dados foram adquiridos e processados pelo Mass Lynxv4.1 (Waters, MA, USA).

Tabela 2: Parâmetros otimizados do MS/MS para a análise cromatográfica das substâncias químicas de interesse analisadas das amostras ambientais coletadas na sub-bacia do Rio João Mendes, Niterói-RJ.

Composto	Modo de ionização (ESI)	Precursor (m/z)	Quantificação			Confirmação		
			Produto (m/z)	EC (V)	Cone (V)	Produto (m/z)	EC (V)	Cone (V)
Sulfametoxazol	ES+	254.0	92.0	30	30	156.0	15	30
Trimetropim	ES+	291.3	230.2	25	50	261.1	25	50
Ibuprofeno	ES-	205.1	161.0	6	20	161.0	6	20
Bisfenol A	ES-	227.0	212.0	18	45	133.0	25	45
17- α etinilestradiol	ES+	295.0	159.0	33	60	145.0	43	60

Legenda: EC: energia de colisão

e. Quantificação das SQI detectadas nas amostras:

Para quantificação dos compostos de interesse foi realizada padronização externa com avaliação da linearidade, através da construção de curva de uma calibração, baseada em um modelo de regressão linear. O intervalo da linearidade foi obtido através do preparo de diferentes concentrações em água ultrapura (Mili-Q[®]), onde foram realizadas injeções de sete replicatas de cada concentração. A curva analítica foi ajustada com base na avaliação do nível de incerteza dos dados ($\leq 20\%$) e na determinação do coeficiente de correlação linear, sendo este superior a 0,98, conforme recomendado pela ANVISA.

O limite de detecção do método foi calculado através da equação $LD = t_{(n-1, 1-\alpha)} \times s$, onde t representa o valor do teste t-student unilateral, para um nível de confiança de 95% e para $n-1$ graus de liberdade, sendo n o número de ensaios e s correspondendo ao desvio-padrão associado à média das replicatas da menor concentração padrão ou branco fortificado (INMETRO, 2007). O Limite de quantificação foi expresso como a menor concentração que pode ser medida da curva analítica, segundo ICH (2005).

A recuperação foi verificada através de ensaios de spiked (água fortificada) em água na faixa de concentração média esperada dos compostos alvo (20 µg/L), em um volume de 500 mL, conforme procedimento analítico proposto (extração em água Mili-Q®). Os dados obtidos foram condicionados ao coeficiente de variação ($CV \leq 20\%$).

Tabela 3: Parâmetros estatísticos referentes ao método de quantificação cromatográfica das amostras ambientais coletadas no P₀, P₁, P₂ e P₃ da sub-bacia do Rio João Mendes, Niterói - RJ.

Analito	Linearidade (µg/L)	Equações da curva	R ²	Erro padrão	Incerteza (%)	LD (µg/L)	LQ (µg/L)
Sulfametoxazol	0.1 - 50.0	$y = 1005.2x + 42.163$	0,9993	0,0007	10,19	0,02	0,1
Trimetropim	0.5 - 50.0	$y = 3225.2x + 965.92$	0,9984	0,0016	4,08	0,03	0,5
Ibuprofeno	1.0 - 50.0	$y = 36.078x + 10.882$	0,9939	0,0061	9,32	0,14	1.0
BPA	1.0 - 50.0	$y = 42.656x + 36.128$	0,9918	0,0082	12,14	0,47	1.0
17- α etinilestradiol	2.5 - 50.0	$y = 11.177x - 6.998$	0,9923	0,0077	10,78	1,27	2.5

3.4.2. Cálculo de Risco Químico

O risco químico foi calculado de acordo com a metodologia utilizada por Mendes (2016), que foi baseada e adaptada da metodologia proposta por Jensen & Mesman (2006), a qual se baseou no cálculo da pressão tóxica de cada substância quantificada, seguido da correção dos valores em relação à área de referência e do cálculo do risco integrado de diversas substâncias químicas, conforme as equações abaixo:

a) Cálculo da Pressão Tóxica (R3) de cada substância

$$R3 = 1 / (1 + (\exp^{(\log R2 - \log R1) / \beta})) \quad \text{Eq (1)}$$

Onde:

R3 = pressão tóxica de cada substância

R2 = valores de referência para os contaminantes contidos na legislação utilizada

R1 = concentração de cada substância nos pontos de coleta

β = valor padrão estabelecido por meio de ensaios ecotoxicológicos ($B=0,4$)

b) Correção dos valores obtidos em relação à área referência

$$R4 = (R3 - R3_{ref}) / (1 - R3_{ref}) \quad \text{Eq (2)}$$

c) Cálculo do risco integrado para n substâncias químicas

$$R5 = 1 - ((1 - R4)_1 \cdot (1 - R4)_2 \cdot (1 - R4)_3 \dots (1 - R4)_n) \quad \text{Eq (3)}$$

3.5. Análises referentes à Linha de Evidência (LoE) Ecotoxicológica

3.5.1. Ensaio em Amostras de Água Superficial

Os ensaios ecotoxicológicos foram realizados com espécies de quatro níveis tróficos:

- Microalga *Raphidocelis subcapitata*: avaliação da toxicidade crônica de acordo com NBR 12648:2011 (ABNT 2011);
- Microcrustáceos *Ceriodaphnia dubia*: avaliação da toxicidade crônica, de acordo com NBR 13373:2017 (ABNT 2017);
- Peixes *Oreochromis niloticus* (Tilápia-do-Nilo): avaliação de genotoxicidade, de acordo com protocolo estabelecido por Salomão *et al* (2015);
- Levedura *Saccharomyces cerevisiae*: avaliação de atividade estrogênica *Yeast Estrogen Screen* (YES), seguindo o protocolo estabelecido no LABIFI desde 2014, baseado em Routledge *et al.*, (1996).

3.5.1.1 Ensaio com microalgas:

A espécie de microalga utilizada nos ensaios foi cultivada no LABIFI-UERJ. Todos os ensaios foram realizados em três etapas: preparo do inóculo, preparo do ensaio com as amostras e contagem das algas em microscópio óptico.

a. Preparo do inóculo:

Uma alíquota dos organismos foi inoculada em frascos do tipo Erlenmeyer de 250 mL, devidamente lavados e esterilizados, contendo 150 mL de meio L.C. Oligo, preparado conforme recomendado no Anexo A da NBR:ABNT 12648:2011, e foram mantidos em incubadora com temperatura controlada (25 °C) e luz contínua por 7 dias ou até que fosse verificado um crescimento

exponencial das algas (Figura 12). Após esse período, foi feita a preparação do ensaio.

b. Preparação do ensaio:

Para a execução do ensaio, foi necessário preparar a amostra ambiental. Para isso, em 500 mL de amostra foram adicionados 7 soluções de acordo com a tabela 4.

Tabela 4: Soluções utilizadas para o preparo das amostras ambientais dos pontos P₀, P₁, P₂ e P₃ durante a realização dos ensaios com microalgas.

	Solução	Concentração (mg/mL)	Volume de solução utilizado (mL)
1	Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	0,4	1,0
2	KNO ₃	1,0	1,0
3	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,3	1,0
4	K ₂ HPO ₄	0,4	1,0
	CuSO ₄ .5H ₂ O	3x10 ⁻⁶	0,5
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	6x10 ⁻⁶	0,5
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	6x10 ⁻⁶	0,5
5	Mn(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	6x10 ⁻⁶	0,5
	H ₃ C ₆ H ₅ O ₇ .H ₂ O	6x10 ⁻⁶	0,5
	H ₃ BO ₃	6x10 ⁻⁶	0,5
	C ₆ H ₅ FeO ₇ .5H ₂ O	1,625x10 ⁻⁵	0,5
6	FeSO ₄ .7H ₂ O	6,25x10 ⁻⁵	0,5
	FeCl ₃ .6H ₂ O	6,25x10 ⁻⁵	0,5
7	NaHCO ₃	1,5x10 ⁻³	1,0

Posteriormente, a solução resultante foi avolumada com a amostra à 1000 mL. Esse procedimento de preparação das amostras foi repetido para o preparo da solução referente à cada um dos 4 pontos de coleta que seria utilizada, utilizando as soluções da tabela 4.

O ensaio foi realizado com 6 replicatas de cada ponto amostral. As algas do inoculo foram introduzidas nos Erlenmeyer de 125 mL contendo 75 mL da amostra ambiental preparada (P₀, P₁, P₂ e P₃), de forma que a concentração final das algas unicelulares estivesse entre 10³ e 10⁵ cel./mL.

As soluções foram incubadas por 96 h à 25°C e mantidas em luz constante com agitação manual duas vezes ao dia (Tabela 5 e Figura 12). Ao final do período de exposição, o ensaio foi encerrado, preservando-se as amostras em

Eppendorfs de 2,5 mL contendo 1,0 mL de amostra e uma gota de solução de lugol, sendo um Eppendorf por replicata, para posterior contagem celular em microscópio óptico.

Tabela 5: Parâmetros experimentais adotados durante a realização dos ensaios ecotoxicológicos com *R. subcapitata*, segundo a norma ABNT-NBR: 12.648:2011.

Requisitos	Condições
Ensaio:	Estático
Inóculo:	Cultivo em fase exponencial de crescimento
Replicatas por ponto amostral:	Seis
Temperatura:	24°C +/- 2°C
Iluminação:	Constante à 5.000 lux
Agitação:	Manual
Efeito observado:	Inibição e estímulo à multiplicação de células algáceas
Expressão dos resultados:	Não tóxico e toxicidade crônica

Figura 12: Incubadora onde foi realizado o cultivo das microalgas utilizadas nos ensaios à 25°C, em luz constante.



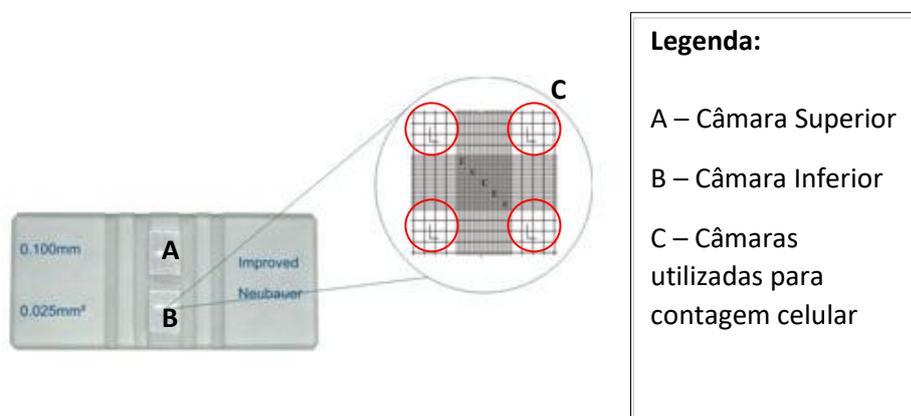
c. Contagem das algas em microscópio óptico:

A contagem de células foi realizada em microscópio óptico da marca Nikon (modelo Elipse E200) com 400x aumento, utilizando-se a câmara de Neubauer. Trata-se de uma lâmina de vidro, dividida em 2 câmaras, sendo uma superior (A) e outra inferior (B), contendo 9 quadrantes em cada (C), cada um deles subdividido em 16 quadrantes de $1/25\text{mm}^2$ (Figura 13).

Foram contabilizadas as células visualizadas nos quadrantes laterais (Figura 13) das câmaras superior e inferior. Para a contagem final do número de células foi realizada com a média desses valores. O número de células obtidas foi multiplicado por 2.500 que corresponde ao número total de quadrantes da lâmina, para se obter o número total de células de microalgas presentes em cada amostra analisada. Desse valor foi subtraído o valor de biomassa algácea inicial, ou seja, inoculada no dia em que o ensaio foi preparado. O valor final foi comparado com os valores obtidos nos ensaios controle, para verificação do efeito crônico de inibição de crescimento de biomassa ao longo das 96 h de ensaio.

Os resultados de efeito tóxico e não-tóxico foram obtidos aplicando-se análise estatística de acordo com a Norma ABNT – NBR:ABNT 12648:2011, onde foi aplicada teste t seguido pelo teste Mann-Whitney de comparação entre as amostras e o controle e entre as amostras (P_1 , P_2 , P_3) e o P_0 , com auxílio do software *GraphPad Prism 5*.

Figura 13: Câmara de Neubauer utilizada para a contagem de células de microalgas durante os ensaios. (Adaptado de: www.casalab.com).



3.5.1.2 Ensaio com microcrustáceos:

Para verificar os efeitos de toxicidade crônica nos microcrustáceos da espécie *Ceriodaphnia dubia*, foram realizados ensaios de exposição às amostras ambientais de acordo com a Norma da ABNT–NBR: 13.373:2017. Esse ensaio teve como objetivo avaliar sobrevivência e reprodução dos organismos quando em contato com a amostra, num período de 7 dias (168 h).

Os organismos utilizados foram cultivados no LABIFI-UERJ, de acordo com as condições estipuladas no Anexo A da Norma da ABNT – NBR: 13.373:2017.

Os organismos foram cultivados em água mineral da marca Bioleve, com os ajustes necessários de pH (6,0 – 7,0) e dureza (40 - 48 mg CaCO₃/L). Para ajuste do pH, foi utilizada uma solução de Ácido clorídrico (HCl), já para o ajuste da dureza foi necessária apenas a adição de água destilada, pois a dureza da água mineral da Bioleve costuma estar um pouco acima daquela recomendada pela norma, necessitando apenas de diluição.

Os ensaios foram realizados com dez replicatas de cada ponto amostral, e mais dez replicatas para o controle do ensaio (apenas com a água mole de cultivo). Os ensaios foram realizados em frascos de acrílico cilíndricos (em material inerte) de 20 mL. As condições dos ensaios seguiram a Norma ABNT–NBR: 13.373:2017 e estão descritas na tabela 6. Cada frasco continha uma fêmea de 6 à 24 h de vida e 15 mL da amostra ambiental (sem diluição). Diariamente foi feita a limpeza dos frascos, tanto para a retirada de sujeira quanto para a retirada dos filhotes gerados (neonatos) por partenogênese. Os organismos foram alimentados a cada dois dias com cultura algácea. Os dados de reprodução e sobrevivência das fêmeas foram contabilizados e posteriormente os filhotes (neonatos) descartados.

Tabela 6: Parâmetros experimentais adotados durante a realização dos ensaios ecotoxicológicos com *Ceriodaphnia dubia*, segundo norma ABNT-NBR 13.373:2017. Fonte: Adaptada de ABNT – NBR 13.373:2017.

Requisitos	Condições
Sistema de ensaio:	Semiestático
Organismo-teste:	6 h a 24 h
Água de diluição:	Água mole
Volume soluções-teste/recipiente:	15 mL
Número mínimo de soluções-teste:	quatro + controle
Número mínimo de replicatas/soluções-	10

teste:	
Número de organismos por recipiente:	Uma fêmea
Alimentação:	Sim
Temperatura:	23 °C a 27 °C
Fotoperíodo:	12 h a 16 h de luz fria
Renovação da solução-teste:	Uma vez por semana
Efeito observado:	Sobrevivência e reprodução
Expressão dos resultados:	Tóxico e Não-tóxico

Ao final dos 7 dias, foi realizada uma comparação entre o número médio de fêmeas sobreviventes e filhotes gerados nos frascos correspondentes a cada ponto amostral, comparando com o número observado no grupo controle do ensaio. Os resultados de efeito tóxico e não-tóxico foram obtidos aplicando-se análise estatística de acordo com a Norma ABNT – NBR: 13.373:2017, onde foi aplicada ANOVA oneway seguida pelo teste de comparação múltipla Dunnett' entre as amostras e o controle e entre as amostras (P_1 , P_2 , P_3) e o P_0 , com auxílio do software *GraphPad Prism 5*.

3.5.1.3 Ensaio com Peixes

Os ensaios de genotoxicidade foram realizados seguindo a metodologia descrita em SALOMÃO & MARQUES (2015), como uma alternativa aos testes envolvendo comunidades de organismos diretamente na natureza. A espécie de peixe selecionada foi *Oreochromis niloticus*, vulgarmente conhecida como Tilápia do Nilo (Figura 14). Essa espécie foi utilizada nos bioensaios onde o objetivo foi determinar os níveis de genotoxicidade em amostras ambientais de água, através da contagem dos micronúcleos em células sanguíneas (eritrócitos) e o cálculo da frequência de aparecimento a cada 1000 células (‰).

Os peixes utilizados nos ensaios foram adquiridos da Fundação Instituto de Pesca do Estado do Rio de Janeiro (FIPERJ), sendo selecionados somente os indivíduos que não foram expostos a nenhum tratamento com hormônios durante o seu desenvolvimento, a fim de evitar qualquer alteração genética nos indivíduos que pudesse alterar as respostas aos testes. Estes foram cultivados no laboratório até que atingissem um tamanho ideal para a retirada de sangue para realização dos ensaios.

Figura 14: *Oreochromis niloticus* utilizados nos ensaios. Fonte: SALOMÃO (2014).



Os indivíduos foram mantidos em contato com as amostras de águas superficiais por um período de 7 dias. Após o período de exposição, o sangue foi coletado a partir da veia caudal de cada organismo utilizando seringas rinsadas com heparina (12.7 mm × 0.33 mm agulha).

As lâminas foram preparadas com o esfregaço de uma gota de sangue ($\pm 10 \mu\text{L}$) e secas em temperatura ambiente. Após a secagem completa do material, a lâmina foi submetida a um banho de 15 minutos em Metanol (100%) para a fixação e lavada em água corrente. Após a secagem, a lâmina foi corada por 10 minutos em Giemsa 5%, e novamente lavada em água corrente (SALOMÃO; MARQUES, 2014; 2015). Ao final do processo as lâminas foram colocadas no suporte para secagem completa em temperatura ambiente.

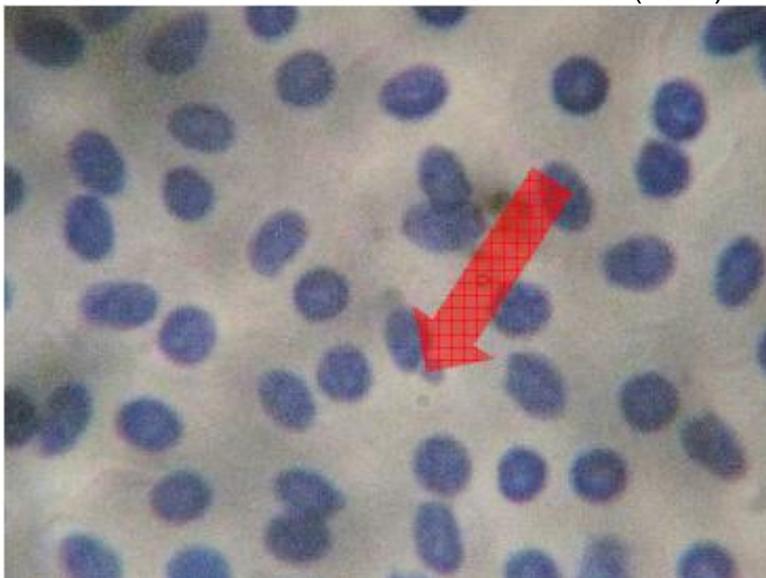
As lâminas foram observadas em microscópio óptico em resolução de 1000x (com imersão em óleo) para contagem dos micronúcleos (MN). Em cada lâmina foram observadas 2.000 células (duas lâminas em cada uma das 5 replicatas por amostra, totalizando 10 lâminas por amostra e 20.000 células por amostra).

Para identificação dos MN (Figura 15), foram utilizados os critérios descritos por Fenech *et al* (2003), sendo eles:

- a. MN deve ter um terço a menos do tamanho do núcleo original;
- b. MN não deve encostar no núcleo principal da célula;
- c. MN deve se apresentar na mesma coloração do núcleo celular principal.

As frequências de MN foram expressas por mil células (%). A comparação estatística entre o grupo controle negativo e as amostras coletadas foram realizadas utilizando o programa *GraphPad Prism 5* com t-Test seguido por Mann-Whitney Test ($p < 0.05$).

Figura 15: Eritrócitos de peixes utilizados para a análise de micronúcleos. Fonte: SALOMÃO (2014).



3.5.1.4 Ensaio com Levedura pela Metodologia YES

Os ensaios de detecção de estrogenicidade – *Yeast Estrogen Screen* (YES) foram realizados com cepas recombinantes (modificadas geneticamente) da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, seguindo protocolo estabelecido no LABIFI desde 2014, baseado em Routledge *et al.*, (1996). Para a realização do ensaio YES, este foi dividido em cinco etapas, sendo elas: preparo do pré-inóculo; preparo do inóculo; preparo da levedura e do meio de análise; preparo das diluições e das placas para leitura e leitura das placas.

a) Preparo do pré-inóculo:

Para o preparo do pré-inóculo, um tubo criogênico de 2 mL contendo as cepas preservadas em glicerol 40 % foi descongelado e o conteúdo foi adicionado à um tubo T contendo 10 mL de meio de cultivo. O pré-inóculo foi então colocado na incubadora orbital por 48 h, a 150 rpm, 28°C.

b) Preparo do inóculo:

Para a preparação do inóculo, 100 μL do pré-inóculo foram adicionados à 10 mL do meio de cultivo no tubo T e mantido por 24 h na incubadora orbital, a 150 rpm, 28°C para crescer e poder então ser utilizado no ensaio.

c) Preparo da levedura e do meio de análise:

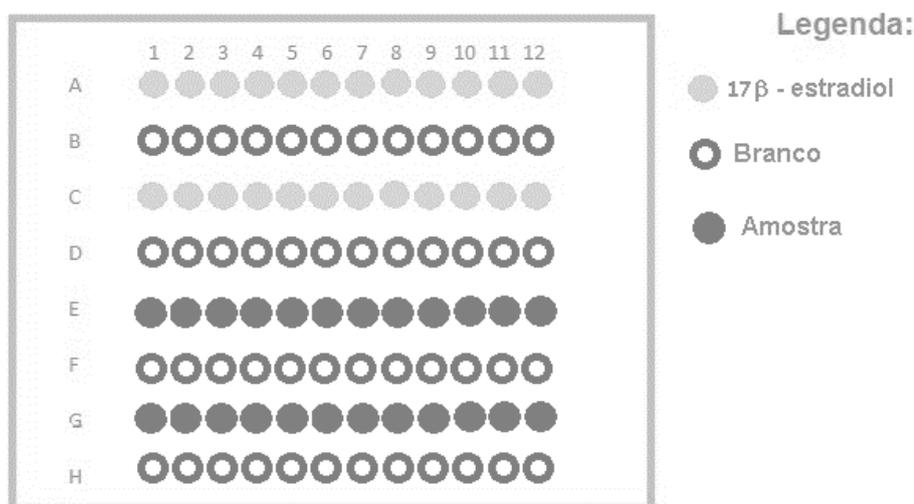
Para o preparo da levedura, foram adicionados 4 mL de meio de cultivo e 3 mL de levedura (do inóculo de 24h) em um tubo Falcon de 50 mL, para obter uma solução com aproximadamente 4×10^7 células.

Já para o preparo do meio de análise foram adicionados 25 mL de meio de cultivo + 250 μL de solução de CPRG (10mg/mL) + 25 μL da solução do tubo preparado anteriormente.

d) Preparo das diluições e placas de ensaio:

As diluições utilizadas para o ensaio YES foram realizadas em uma placa de material plástico inerte estéril contendo 96 poços, identificadas de acordo com a composição da amostra a ser analisada, conforme ilustrado abaixo. Os ensaios contendo soluções diluídas da amostra e soluções diluídas de 17 β -estradiol foram realizados em duplicatas (Figura 16).

Figura 16: Esquema de preparo das placas de diluição.



Para os poços referentes ao branco, foram adicionados 10 μL de etanol absoluto em cada poço. Já para os poços referentes à amostra e ao E2, foi

necessário realizar diluições sucessivas de fator 2 de diluição em outra placa para formar o gradiente de concentrações.

Preparo das diluições:

Para realizar as diluições do E2, foram adicionados 200 μL do hormônio padrão ao poço 1 e 100 μl de etanol para os poços de número 2 a 12. Em seguida, foram retirados 100 μL da solução presente no poço 1 e adicionados ao poço 2. A nova mistura foi homogeneizada e 100 μL foram transferidos para o poço 3, seguidos de homogeneização e assim por diante até o poço de número 12.

As diluições da amostra seguiram o mesmo protocolo das diluições do hormônio, sendo substituídos os 200 μL de hormônio do poço 1 pelo mesmo volume de amostra.

Preparo das placas de leitura:

Após a realização das diluições, 10 μL de amostra foram adicionados aos poços correspondentes na placa de leitura, ou seja, 10 μL de amostra do poço 1 da placa de diluição foram adicionados ao poço 1 referente à placa de leitura da amostra e assim por diante. O mesmo foi feito com o E2, onde os 10 μL de amostra foram substituídos por 10 μL de hormônio na placa de leitura.

Após todos os poços estarem com 10 μL de amostra, etanol ou hormônio, elas foram deixadas em temperatura ambiente para evaporação do líquido. Em seguida, foram adicionados 200 μL do meio de análise (que continha as células de levedura) em cada poço da placa de leitura, que logo após foi agitada por 2 minutos para homogeneizar o conteúdo dos poços.

Todas as etapas realizadas até a incubação das amostras foram realizadas em fluxo laminar, garantindo uma condição de ambiente estéril, evitando a contaminação por outros microrganismos comumente encontrados no ambiente.

e) Leitura das placas:

Depois de todos os compostos terem sido adicionados às placas e os conteúdos estarem devidamente homogêneos, as placas foram levadas para a

incubadora à 30°C por 72 h e após esse período, foi realizada sua leitura de absorbância em espectrofotômetro Spectra Max[®] M3, sob os comprimentos de onda de 575 nm - para leitura da cor e assim, verificação da atividade estrogênica - e 620 nm - para leitura da turbidez, que indica o crescimento da cepa de *S. cerevisiae*.

O resultado de absorbância obtido para cada poço foi utilizado no software Origin versão 8.0 para calcular o equivalente estradiol (EQ-E2) de cada amostra, calculado a partir da equação 4:

$$Y = A2 (A1-A2) / (1+(X/X_0^p)) \quad \text{Eq (4)}$$

Onde:

Y = Valor de absorbância corrigida da amostra

A1 = Máxima indução de β -galactosidase

A2 = Mínima indução de β -galactosidase

X = Concentração da substância estrogênica no ensaio (EQ-E2 da amostra)

X₀ = Valor de CE50*

p = Inclinação da curva dose-resposta obtida

* Concentração Efetiva Mediana (CE50), ou seja, concentração do efluente que causa efeito aguda a 50 % dos organismos.

** Em negrito, parâmetros referentes à curva de controle positivo dos 17 β -estradiol.

3.5.2 Cálculo de Risco Ecotoxicológico

O risco ecotoxicológico para as amostras ambientais foi calculado seguindo a metodologia proposta por Mendes (2016) e com base nos resultados dos ensaios realizados com a espécie de microalga *R. subcapitata*, o microcrustáceo *C. dubia*, os ensaios de genotoxicidade com peixes da espécie *O. niloticus* e os ensaios de avaliação de atividade estrogênica com leveduras modificadas da espécie *S. cerevisiae*. Essa metodologia foi composta por três passos:

Divisão dos valores X (expressos em porcentagem) por 100 (R1):

$$R1 = X/100 \quad \text{Eq(5)}$$

Correção dos valores obtidos em relação à área referência:

$$R2 = (R1-Ref) / (1-Ref) \quad Eq(6)$$

Onde:

R1 = valores obtidos na etapa 1 – equação 5;

Ref. = resultados obtidos na área considerada referência;

Aplica-se a fórmula Risco:

$$R3 = \log (R2-1) \quad Eq(7)$$

Para o cálculo do risco ecotoxicológico integrado, foram realizados mais dois passos:

Calcula-se a média aritmética dos valores obtidos na etapa 3 – equação 7 (R4).

$$R4 = (R3_1 + \dots + R3_n) / n \quad Eq(8)$$

Integra-se os resultados dos ensaios através do cálculo de R5:

$$R5 = 1 - (10^{-R4}) \quad Eq(9)$$

Onde:

R5 = risco integrado da linha ecotoxicológica.

3.6. Cálculo do Risco Integrado e peso das linhas de evidências (WoE)

O cálculo de risco integrado para cada ponto de coleta foi realizado com os valores de risco encontrados para cada linha de evidência estudada. Esse cálculo foi realizado em duas etapas, seguindo-se Mendes (2016):

a) Cálculo dos valores de R1:

$$R1 = (1-\log X) \quad Eq(10)$$

Onde X = o valor de risco associado à cada LoE

b) Cálculo das médias aritméticas ponderadas R2:

$$R2 = \frac{\text{LoE(Química)}*A + \text{LoE (Ecotoxicológica)}*B}{A + B} \quad \text{Eq(11)}$$

Onde:

A = Peso da LoE Química

B = Peso da LoE Ecotoxicológica

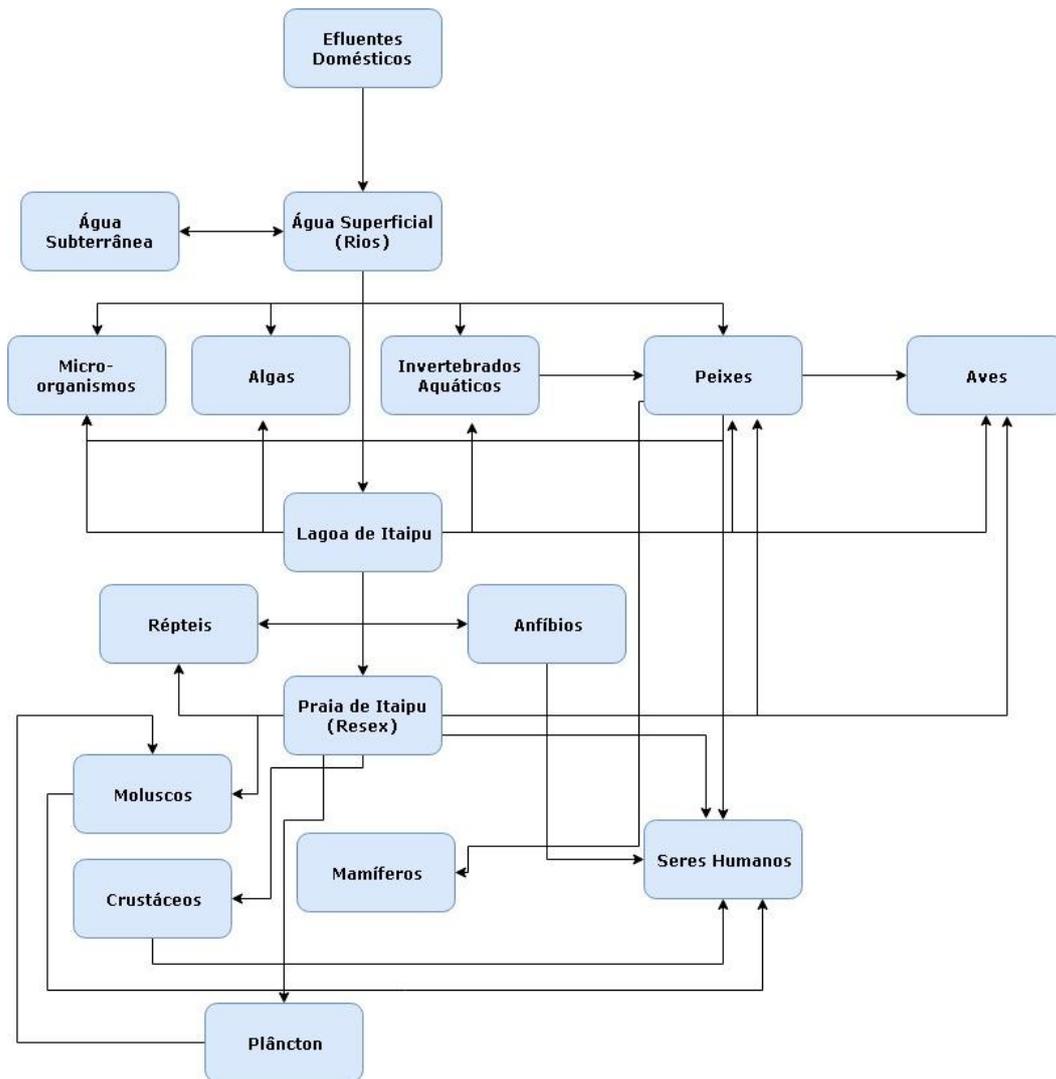
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Modelo Conceitual da Área (MCA)

Um Modelo Conceitual da Área (MCA) da Sub-bacia do Rio João Mendes foi elaborado com o intuito de auxiliar na compreensão dos possíveis efeitos e impactos ambientais causados pela possível presença de alguns compostos químicos, oriundos de lançamentos de efluentes domésticos sem tratamento e de forma irregular, sobre a fauna e flora da região. Para isso, foram levantados dados em publicações científicas referentes à biota local, além de levantamentos sobre o clima, o relevo e os aspectos hidrogeológicos da região. O modelo MCA foi estruturado seguindo os modelos de Niemeyer *et al.* (2010) e Mendes (2016).

Na figura 17 estão representados os principais indivíduos expostos aos poluentes presentes no Rio João Mendes contaminado com efluentes domésticos, bem como os compartimentos ambientais suscetíveis à contaminação e à alteração das suas propriedades físico-químicas.

Figura 17: Modelo conceitual da área de estudo.



4.2. Parâmetros Físico-Químicos

Tabela 7: Resultados dos ensaios físico-químicos realizados com as amostras de água coletada do Rio João Mendes, Niterói – RJ, durante as 4 coletas de coleta, ocorridas nos meses de março, maio, julho e setembro/ 2017.

Pontos Coleta	pH	OD (mg/L)	CE (μ S/cm ²)	Turbidez (NTU)	Temp. líq. (°C)	ORP (mV)	ST (mg/L)	STD (mg/L)	SST (mg/L)	STF (mg/L)	STV (mg/L)	DQO (mg/L)	COT (mg/L)	Fósforo (mg/L)	Amônia (mg/L)	
Conama 357	6,0 - 9,0	>5	-	<100	-	-	-	<500	-	-	-	-	-	<0.05	3.7 (pH ≤ 7.5)	
Coleta 1	P0	5,7	6,4	168	0,0	25,0	167	252	109	143	32	111	2,1	1,4	<0.05	0,3
	P1	6,7	4,3	782	23,7	27,0	30	903	501	402	242	160	107,3	39,2	11,0	60,2
	P2	7,2	4,8	731	16,1	29,0	64	898	468	430	296	134	89,8	28,7	9,2	52,0
	P3	7,2	3,1	814	44,2	31,0	-3	1051	521	530	242	288	137,3	37,3	9,8	53,5
Coleta 2	P0	5,7	7,1	186	0,6	22,0	235	225	121	104	44	60	2,8	1,6	0,2	0,3
	P1	6,4	1,7	804	13,2	24,0	-92	837	515	322	220	102	108,8	24,7	9,0	18,7
	P2	7,2	2,0	795	8,8	24,0	-118	868	508	360	260	100	107,5	20,4	9,2	17,1
	P3	7,4	2,2	953	16,6	28,0	-116	1040	610	430	338	92	133,8	15,9	6,8	14,7
Coleta 3	P0	5,3	5,9	134	0,0	20,8	187	239	87	152	52	100	2,6	1,0	<0.05	0,02
	P1	6,9	3,7	711	6,9	23,5	-112	745	455	290	222	68	125,0	12,1	9,2	22,1
	P2	7,3	2,9	692	13,0	24,7	-156	861	443	418	384	34	108,8	11,7	7,0	18,9
	P3	7,4	2,9	655	14,2	25,6	-104	799	419	380	356	24	117,5	10,4	6,3	6,6
Coleta 4	P0	6,9	6,3	0,09	0,0	21,8	224	258	54,00	204	36	168	2,2	1,2	<0.05	<LD
	P1	7,7	5,2	962	10,0	23,1	-141	1146	616	530	248	282	256,0	22,5	13,7	52,9
	P2	7,7	4,4	841	0,0	25,2	-5	970	538	432	102	330	140,5	378,8	7,6	30,8
	P3	7,8	4,5	692	0,0	24,3	-58	749	443	306	60	246	137,3	1338	6,1	18,2

Nota: * Para a classificação do Rio João Mendes, Niterói – RJ, foi levado em consideração o Art. 42 da Conama 357/05.

Nota 2: Os valores em negrito encontram-se acima dos limites permitidos para corpos hídricos de classe 2, conforme previsto na CONAMA 357/05 (BRASIL, 2005).

A amônia ocorre naturalmente nos corpos hídricos devido à: degradação dos compostos orgânicos e inorgânicos presentes no solo e na água; excreção dos organismos aquáticos; transformação do nitrogênio gasoso por micro-organismos e trocas gasosas com a atmosfera (REIS & MENDONÇA, 2009). Esses fatores explicam em parte as baixas concentrações de amônia no P₀. No entanto a amônia pode ser introduzida nos corpos hídricos por fontes antrópicas, sendo normalmente encontrada em efluentes industriais e sanitários. Em efluentes sanitários a presença de amônia ocorre com a degradação biológica de aminoácidos e pela hidrólise da ureia e de outros compostos nitrogenados.

Nos pontos P₁, P₂ e P₃, foram detectados teores de amônia que variaram entre 6,6 e 60,2 mg/L, bem acima dos limites previstos pela legislação RC 357/05. Essas altas concentrações foram verificadas em função dos constantes lançamentos de efluentes domésticos *in natura* nos locais de coleta. Dentre esses três pontos amostrais, o P₁ merece destaque, já que teve a maior concentração observada nas 4 coletas. Uma possível explicação é a presença de um salão de beleza que provavelmente lança seu efluente diretamente no corpo hídrico analisado. A amônia está presente nas fórmulas de tinturas de cabelo e outros produtos de beleza que acabam sendo lançadas nos efluentes domésticos (SOUZA & NETO, 2009; <http://www.catolica-to.edu.br>. Acessado em 18.02.2018).

O fósforo é o principal nutriente que desencadeia processos de eutrofização e seu lançamento nos corpos hídricos pode ocorrer, entre outras fontes, por meio do lançamento de efluentes domésticos (CHAO, 2006). A presença de fósforo neles pode ter origem de deposição atmosférica ou ainda dos processos de decomposição das rochas presentes na bacia de drenagem. As regiões do entorno dos pontos amostrais P₁, P₂ e P₃ são densamente ocupadas por residências, o que pode ser observado em toda extensão da Sub-Bacia do Rio João Mendes. Durante as coletas foi possível verificar a existência de pontos de lançamento de efluentes domésticos, o que explicaria os níveis de fósforo tão elevados detectados durante as análises. A menor concentração de fósforo (6,1 mg/L) foi verificada no P₃ durante a coleta 4. Essa concentração foi 120x superior aos níveis máximos permitidos pela RC 357/07 (<0,05 mg/L). As baixas concentrações de fósforo encontradas P₀ atenderam aos limites legais

permitidos e se justificam pela ausência de casas no entorno da nascente do braço principal do João Mendes.

A presença de sólidos dissolvidos (STD) nos corpos hídricos esteve diretamente relacionada à condutividade elétrica e à presença de carbonatos, bicarbonatos, sulfatos, fosfatos, nitrato de cálcio, magnésio e potássio (GASPAROTTO, 2011), incluindo todos os sais e componentes não iônicos (PIRATOBA *et al*, 2017), podendo indicar a carga de poluentes que chegam aos ambientes aquáticos. As maiores concentrações de STD foram verificadas nos pontos P₁, P₂ e P₃ nas coletas 1, 2 e 4. Estes, extrapolaram os limites legais permitidos (<500 mg/L) e foram aproximadamente 5x a concentração de STD verificada para o P₀. Esse aumento da concentração pode ser explicado pela presença do lançamento irregular de efluentes ao longo da sub-bacia e da ocupação das suas margens, que provoca a retirada da mata ciliar e consequentemente deixa o solo mais suscetível aos processos de escoamento (UFMG, Biblioteca Digital).

Os altos valores de DQO, embora não tenham seu limite estabelecido pela CONAMA, tiveram relação diretamente proporcional ao aumento dos STD em todas as 4 coletas e para todos os 4 pontos amostrais, indicando a maior demanda por oxigênio para degradar essas substâncias que se encontravam dissolvidas. Além disso, a faixa típica de DQO encontrada em efluentes domésticos brutos que chegam às ETEs varia de 200-800 mg/L (SALOMÃO, 2009) e alguns dos valores encontrados para os pontos P₁, P₂ e P₃ se aproximaram dos valores mínimos para essa faixa típica, mesmo se tratando de um corpo hídrico, o que corrobora a hipótese de lançamento de esgoto sem tratamento prévio.

As fontes de oxigênio dissolvido para a água são a atmosfera e a atividade primária, enquanto as perdas de OD ocorrem devido ao consumo durante a decomposição de matéria orgânica, pela respiração da biota aquática, além das perdas para a atmosfera e da oxidação de alguns íons (ESTEVEES, 1998). O P₀ manteve níveis de OD aceitáveis dentro dos limites legais previstos (>5 mg/L) pela RC 357/05 durante as 4 coletas. Por outro lado, os pontos P₁, P₂ e P₃ apresentaram valores de OD abaixo dos parâmetros regulados pela legislação. O ponto P₁ apresentou concentrações de OD abaixo do permitido para as três

primeiras coletas. Os pontos P₂ e P₃ mantiveram as taxas de OD inferiores à 5 mg/L durante todas as 4 coletas de amostragem. Devido ao fato do rio João Mendes receber efluentes domésticos possivelmente sem tratamento ao longo de toda a sua sub-bacia, acredita-se que os baixos valores de OD verificados para os pontos P₁, P₂ e P₃ sejam consequência do processo de degradação da matéria orgânica e outros compostos ali presentes.

Outro parâmetro físico-químico que reforçou a baixa no OD relacionados com a degradação de compostos químicos presentes na água foi o COT. Para todos os pontos esse parâmetro cresceu paralelamente à queda do OD, confirmando a existência de matéria orgânica.

4.3. Linha de Evidência Química

4.3.1. Água superficial

As SQI presentes nas amostras coletadas nas 4 coletas foram detectadas e quantificadas através de análises cromatográficas e seus resultados encontram-se apresentados na tabela 8.

Como não há nenhuma legislação brasileira que regule os limites máximos permitidos para as SQI estudadas em água superficial, foi necessário recorrer a legislações internacionais. Ainda assim, o sulfametoxazol, o trimetropim e o ibuprofeno, não possuem seus limites máximos permitidos estabelecidos em nenhuma legislação pesquisada, apenas valores de PNEC determinados pelo governo da Noruega (2006).

Cabe ressaltar que, embora exista legislação regulando os limites máximos para o EE2 (0,035 ng/L), as amostras P₁, P₂ e P₃ analisadas apresentaram concentrações acima dos limites da curva de quantificação do equipamento (UPLC). Esse fato está sendo analisado, para verificação de possíveis interferentes. No entanto, nas amostras do branco (Mili-Q) e nas amostras do P₀, não foi possível a detecção, sendo descartada a hipótese de falha do método ou acúmulo na coluna do equipamento.

Encontram-se em **negrito** os valores quantificados se encontram acima dos limites máximos legais previstos internacionalmente.

Tabela 8: Concentrações médias das SQI nos 4 pontos amostrais nos meses de março, maio, julho e setembro de 2017, sendo P₀ o ponto de referência.

SQI (µg/L)	Coleta 1				Coleta 2				Coleta 3				Coleta 4				PNEC (µg/L)
	P0	P1	P2	P3													
Sulfametoxazol	<LQ	1,74	0,04	0,28	<LQ	0,13	0,80	0,17	<LQ	0,98	0,59	0,87	<LQ	1,58	1,96	2,40	0,118
Trimetropim	0,003	0,036	0,002	0,043	0,003	0,027	0,055	0,011	0,005	0,058	0,043	0,020	0,005	0,053	0,036	0,029	16,0
Ibuprofeno	0,005	4,56	4,20	2,95	0,004	3,86	2,71	1,32	0,008	1,76	2,43	2,05	0,007	10,65	3,85	2,04	20,0
Bisfenol-A*	0,10	0,67	1,06	0,70	0,03	0,16	0,19	0,30	0,17	0,04	0,11	0,09	0,03	0,25	0,43	0,31	0,175
EE2	<LD	>LQ	>LQ	>LQ	3,5e ⁻⁵												

Legenda: EE2 - 17 α -etinilestradiol; PNEC – Predicted no effect concentration.

Durante as coletas **1, 2, 3 e 4**, o P₀ apresentou concentrações referentes às substâncias químicas de interesse dentro dos limites máximos previstos. No entanto, níveis elevados puderam ser encontrados para os demais pontos amostrais ao longo das coletas de coleta.

Para o P₁, os valores de trimetropim e ibuprofeno se mantiveram dentro dos limites aceitáveis, de acordo com o PNEC estipulado pela Noruega, durante as 4 coletas, ou seja, todos foram inferiores à 16,0 e 20,0 µg/L, respectivamente. No entanto, durante todas as coletas as concentrações de sulfametoxazol estiveram acima dos padrões máximos sugeridos pelo governo norueguês (0,118 µg/L). Já para o BPA, somente as coletas 1 e 4 estiveram acima dos padrões máximos sugeridos pela legislação canadense (0,175 µg/L).

Para o P₂, também foi observado que o trimetropim e o ibuprofeno se mantiveram em níveis baixos durante as 4 coletas, de acordo com os PNECs sugeridos. No entanto, nas coletas 1, 2 e 4 as concentrações de BPA ultrapassaram os limites. Nas coletas 2, 3 e 4 o sulfametoxazol ficou acima dos níveis de segurança.

No P₃ o padrão observado para as concentrações de trimetropim e ibuprofeno se manteve, ou seja, durante as 4 coletas esses compostos se mantiveram em concentrações abaixo dos PNECs assumidos. Porém, nas coletas 1, 2, 3 e 4 o sulfametoxazol ficou acima desses limites, assim como o BPA durante as coletas 1, 2 e 4.

Alguns estudos realizados no Brasil e na Europa relatam a presença de sulfametoxazol em corpos hídricos na ordem de µg/L. Locatelli, Sodré e Jardim avaliaram em um trabalho realizado em 2010 concentrações médias de

sulfametoxazol de 0,1 µg/L no Rio Atibaia, localizado em São Paulo. Na Europa. Trovó e colaboradores realizaram um estudo em 2009 analisando as concentrações do mesmo antibiótico em efluentes que saíam de ETEs e em águas superficiais da Espanha, França, Grécia, Itália, Alemanha e Suécia e encontraram concentrações variando de 0,01-2 µg/L nas ETEs e de 0,03-0,48 µg/L em águas superficiais. No presente estudo, o sulfametoxazol foi encontrado em níveis elevados, acima das concentrações detectadas para corpos hídricos pelos estudos mencionados e em concentrações próximas às verificadas para efluentes de saída de ETEs (BASTOS, 2012).

Em um levantamento realizado por Lima e colaboradores acerca da ocorrência de fármacos em águas brasileiras, em 2017, foram detectadas concentrações de Bisfenol-A variando de 0,0012 – 13 µg/L, faixa que engloba os valores detectados no presente trabalho. O mesmo estudo detectou concentrações de Ibuprofeno variando entre $2e^{-5}$ e 4,15 µg/L, faixa que abrange as concentrações detectadas para os pontos amostrais analisados durante as 4 coletas realizadas ao longo da sub-bacia do Rio João Mendes. Ainda sobre esse levantamento, foram detectadas concentrações de trimetropim em corpos hídricos brasileiros variando entre 0,0006 e 1,6 µg/L, valores bem inferiores aos limites máximos regulados internacionalmente, assim como constatado para o corpo hídrico analisado durante as coletas deste trabalho.

4.3.2. Risco Químico

O risco químico para as amostras ambientais coletadas nos 4 pontos amostrais foi calculado a partir das concentrações dos contaminantes de interesse quantificados para cada ponto (figura 18) e comparados ao P_0 . Como o P_0 foi o ponto de comparação este não apresenta risco, e por isso não é apresentado no gráfico da figura 18. Em todas as coletas, o risco químico observado para os 3 pontos amostrais (P_1 , P_2 e P_3) foi considerado extremo.

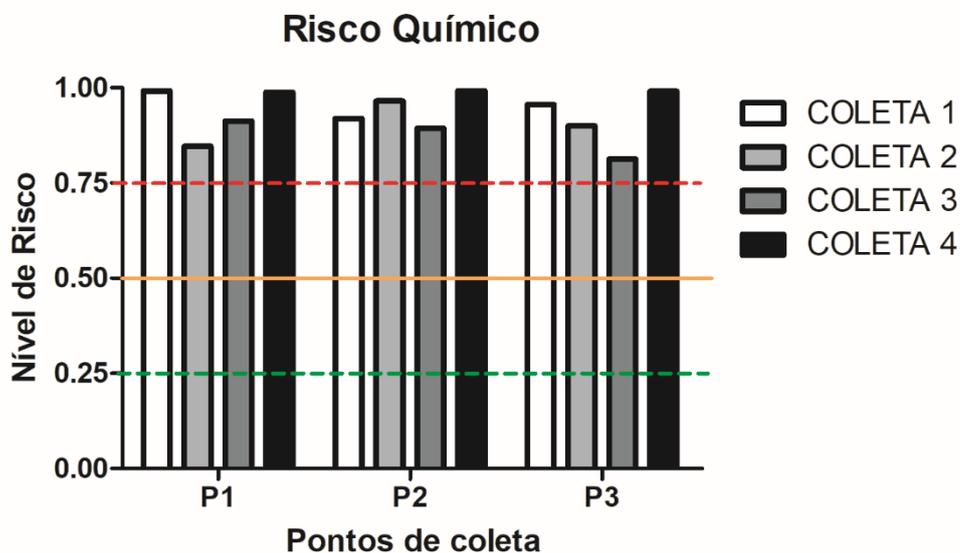
O P_1 apresentou maior risco químico nas coletas 1 e 4, coletas nas quais foram observadas as maiores concentrações de sulfametoxazol e BPA. O antibiótico sulfametoxazol foi encontrado na coleta 1 em concentrações quase 15x superiores aos limites estabelecidos e quase 13x na coleta 3. O BPA foi encontrado quase 3x acima dos limites na coleta 1 e 1,5x aproximadamente na

coleta 4. Por outro lado, durante a coleta 2 foram registradas as menores concentrações de sulfametoxazol, paralelamente ao menor risco químico dentre as 4 coletas.

O ponto 2 apresentou maior risco químico nas coletas 2 e 4, paralelamente às maiores concentrações de sulfametoxazol, 7x e 16x maior do que o limite, respectivamente. O menor valor de risco químico observado para o P₂ foi encontrado para as amostras referentes à coleta 3, na qual foram encontradas as menores concentrações de BPA.

Assim como foi verificado para o P₁, no P₃ os maiores valores de risco químico foram encontrados para as coletas de coleta 1 e 4. Ao mesmo tempo, foram verificadas as maiores concentrações de BPA. A coleta 4 apresentou o maior risco químico e foi encontrada a maior concentração de sulfametoxazol dentre as 4 coletas, excedendo em 20x os limites sugeridos. Já o menor risco foi verificado para a coleta 3, na qual foram detectadas as menores concentrações de BPA.

Figura 18: Risco Químico referente às amostras coletadas nos pontos amostrais P₁, P₂ e P₃ na sub-bacia do Rio João Mendes, Niterói – RJ.



Legenda: 0,00 – 0,25 = risco inexistente; 0,25 – 0,50 = risco moderado; 0,50 – 0,75 = risco alto; > 0,75 – risco extremo (JENSEN & MESMAN 2006 *apud* MENDES, 2016). A linha pontilhada em verde indica início da faixa de risco moderado, a linha contínua em laranja indica o início da faixa de risco alto e a linha pontilhada em vermelho indica o início da faixa de risco extremo.

4.4. Linha de Evidência Ecotoxicológica

4.4.1. Água superficial

Foi feita a avaliação da toxicidade crônica das amostras ambientais dos pontos P₀, P₁, P₂ e P₃, através de alterações nos padrões de crescimento de biomassa para as algas, reprodução para os microcrustáceos, efeito estrogênico sobre a cepa geneticamente modificada de levedura e avaliação de micronúcleos (MN), de forma a verificar a genotoxicidade através de alterações morfológicas (efeitos crônicos) em peixes, conforme resultados exibidos nas tabelas 9 e 10.

Tabela 9: Valores médios (\pm DP) dos ensaios ecotoxicológicos crônicos realizados com *C. dubia* (em média de filhotes) e *R. subcapitata* (em nº de algas) para avaliação de efeito tóxico nos pontos P₀, P₁, P₂ e P₃ durante as 4 coletas.

	Pontos de Coleta	<i>R. subcapitata</i>		<i>C. dubia</i>	
		nº algas	Toxicidade	Média filhotes	Toxicidade
Coleta 1	BR	640.080 \pm 17.346	NT	-	-
	P0	654.455 \pm 3.926	TC	-	-
	P1	670.496 \pm 4.570	TC	-	-
	P2	677.580 \pm 2.153	TC	-	-
	P3	685.080 \pm 1.840	TC	-	-
Coleta 2	BR	648.542 \pm 17.346	NT	60,60 \pm 3,41	NT
	P0	662.917 \pm 3.926	TC	62,62 \pm 2,62	NT
	P1	678.958 \pm 4.570	TC	0,00	TA
	P2	686.042 \pm 2.153	TC	0,00	TA
	P3	693.542 \pm 1.840	TC	0,00	TA
Coleta 3	BR	226.292 \pm 11.199	NT	16,30 \pm 5,87	NT
	P0	239.125 \pm 20.778	TC	11,70 \pm 8,14	NT
	P1	132.333 \pm 30.806	TC	0,00	TA
	P2	104.625 \pm 28.029	TC	0,00	TA
	P3	116.292 \pm 30.441	TC	0,00	TA
Coleta 4	BR	966.788 \pm 306.469	NT	57,90 \pm 4,31	NT
	P0	1,160.000 \pm 141.995	TC	55,22 \pm 3,31	NT
	P1	417.100 \pm 117.172	TC	0,00	TA
	P2	370.017 \pm 62.403	TC	0,00	TA
	P3	510.433 \pm 102.560	TC	0,00	TA

Nota: Em negrito, os valores que apresentaram diferença estatisticamente significativa.

Legenda: NT = Não tóxico, TC = Toxicidade Crônica, TA = Toxicidade Aguda, - = Não avaliado

Para a primeira coleta, não foi possível realizar os ensaios de toxicidade crônica com *C. dubia*, pois o método utilizado ainda estava em processo de validação no LABIFI-UERJ.

Os ensaios com *C. dubia* apresentaram efeitos não tóxicos para o P₀ nas coletas 2, 3 e 4, quando comparado ao ponto controle ($p > 0,05$). Na coleta 1 não foi possível realizá-lo. Já para os pontos P₁, P₂ e P₃, apesar do ensaio analisar o efeito crônico, os ensaios apresentaram efeito tóxico agudo nas coletas em que foi realizado, sendo que todas as fêmeas inoculadas para a realização dos ensaios morreram antes de gerar qualquer filhote.

Os ensaios realizados com *R. subcapitata* indicaram efeitos não tóxicos para o P₀, quando comparado ao controle nas 4 coletas de coleta. Por outro lado, para os pontos P₁, P₂ e P₃, foi observado efeito tóxico crônico para as 4 coletas de coleta, sendo que na coleta 1 e 2 houve estímulo ao crescimento de biomassa algal e nas coletas 3 e 4 houve inibição do crescimento quando comparado ao ensaio controle (figura 19).

Figura 19: Ensaios ecotoxicológicos realizados com *R. subcapitata* nos pontos P₁, P₂ e P₃, indicando a taxa de desenvolvimento dos indivíduos (em nº de algas/mL) nas amostras quando comparado ao P₀ e ao controle (*).

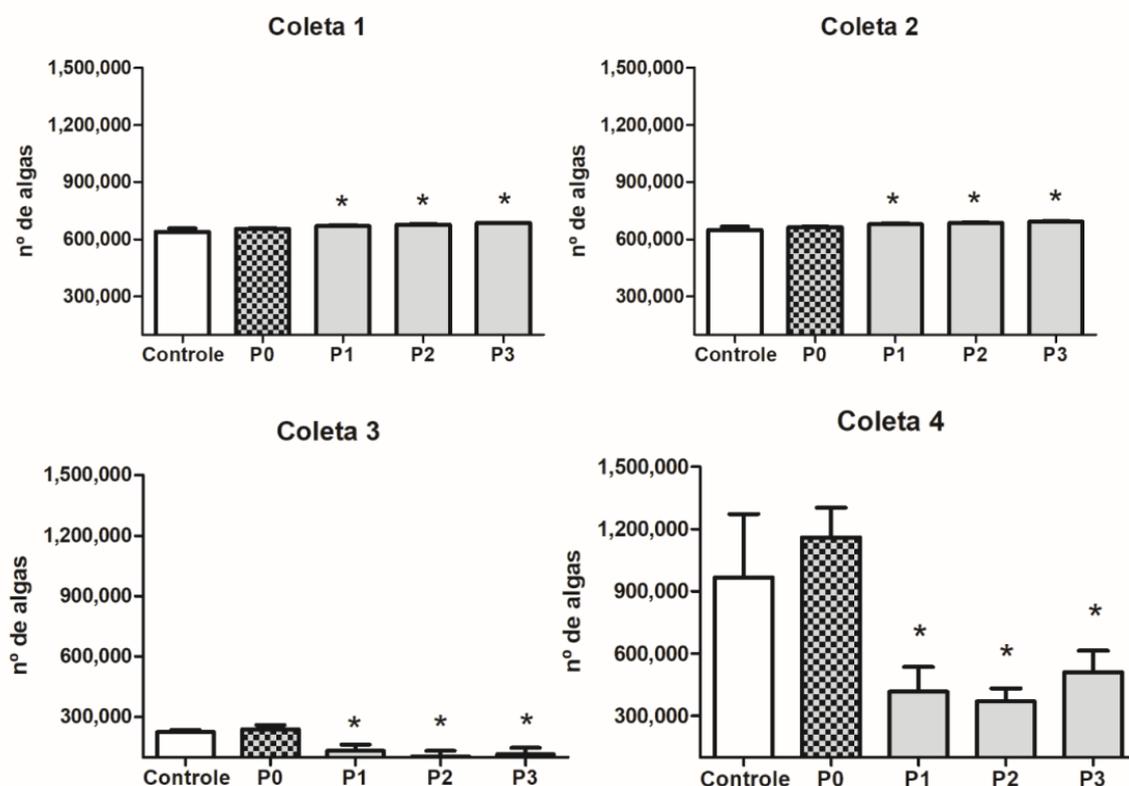


Tabela 10: Valores médios dos ensaios crônicos realizados com *S. cerevisiae* para avaliação da atividade estrogênica (YES) e *O. niloticus* para avaliação da frequência de MN (%), expostos às amostras ambientais.

Pontos de Coleta	<i>O. niloticus</i>		YES			
	Média MN (%)	Toxicidade	EQ – E2 (ng/L)	Toxicidade	CE50 (%)	
Coleta 1	BR	0,05	-	-	-	
	P0	0,05	NT	1,5	NE	4.468,47
	P1	0,25	TC	43,9	AE**	8,31
	P2	0,25	TC	57,9	AE**	5,08
	P3	0,19	TC	37,3	AE**	4,18
Coleta 2	BR	0,05	-	-	-	
	P0	0,05	NT	3,3	NE	106.546,22
	P1	0,13	TC	33,8	AE**	4,58
	P2	0,24	TC	35,7	AE**	5,85
	P3	0,31	TC	24,8	AE**	6,11
Coleta 3	BR	0,05	-	-	-	
	P0	0,08	NT	1,0	NE	>110.000
	P1	0,25	TC	17,4	AE*	13,84
	P2	0,25	TC	39,7	AE*	15,23
	P3	0,36	TC	14,8	AE**	9,01
Coleta 4	BR	0,05	-	-	-	
	P0	0,08	NT	4,30	NE	1.931,89
	P1	0,50	TC	17,65	AE**	6,31
	P2	0,42	TC	49,24	AE*	12,22
	P3	0,67	TC	38,0	AE*	12,41

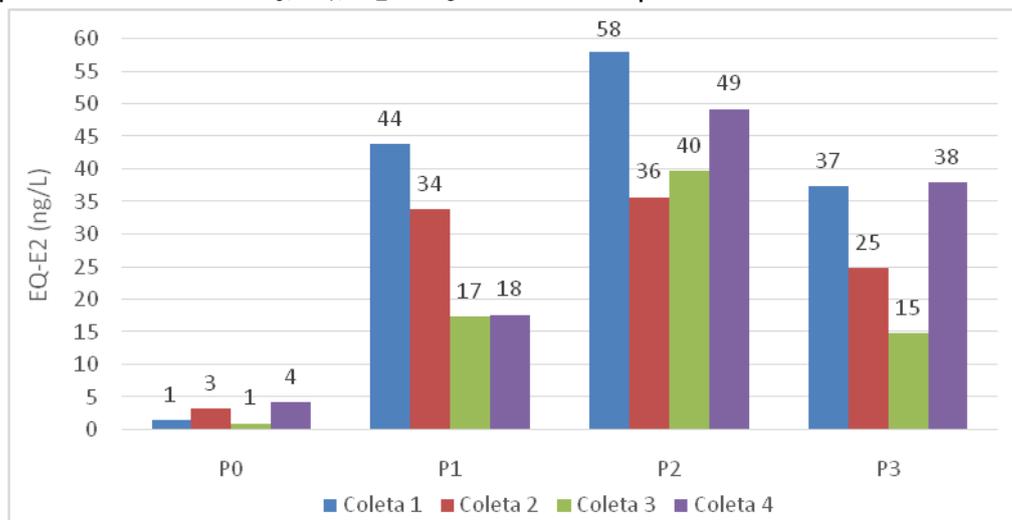
Nota: Em negrito, os valores que apresentaram diferença estatisticamente significativa.

Legenda: NE = Não foi observada atividade estrogênica, AE* = Atividade estrogênica com baixa citotoxicidade, AE** = Atividade estrogênica com alta citotoxicidade, NT = Não tóxico, TC = toxicidade crônica. EQ-E2 ng/L = efeito equivalente estrogênico; CE 50%: concentração de efeito em 50% dos organismos.

Para a coleta 1, foi verificado que o P₀ não apresentou atividade estrogênica durante a realização do ensaio YES, padrão que se manteve nas demais coletas. Por outro lado, o P₁ apresentou atividade estrogênica e citotoxicidade em todas as 4 coletas, sendo que na coleta 1, 2 e 4 a citotoxicidade apresentada foi alta, ou seja, houve morte da cepa mesmo com 50% de diluição da amostra e na coleta 3 foi menor, ou seja, ocorrendo a morte da cepa quando a amostra estava à 100%. Para o P₂ foi verificada citotoxicidade

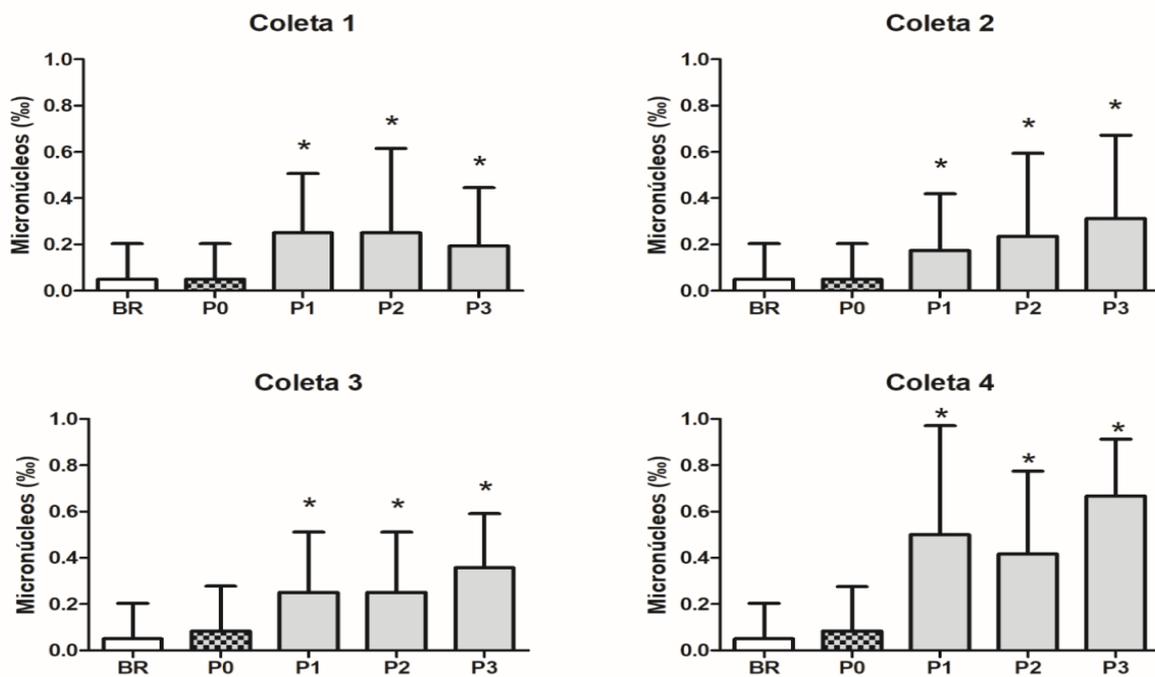
alta nas coletas 1 e 2, e citotoxicidade baixa nas coletas 3 e 4 e a maior atividade estrogênica em média, quando comparada à atividade verificada para os demais pontos (Gráfico 1). P₃ manteve citotoxicidade alta durante as 3 primeiras coletas e baixa na coleta 4.

Gráfico 1: Equivalente-estradiol quantificado no ensaio YES para as amostras de água superficial da sub-bacia do Rio João Mendes, Niterói – RJ, referente aos pontos amostrais P₀, P₁, P₂ e P₃ durante as quatro coletas de coleta.



Em relação à análise de MN, P₀ se manteve não tóxico nas 4 coletas de coleta que foram realizadas e os demais pontos amostrais apresentaram toxicidade crônica, ou seja, apresentaram efeitos genotóxicos significativos ($p < 0,05$) para os ensaios referentes às 4 coletas (figura 20).

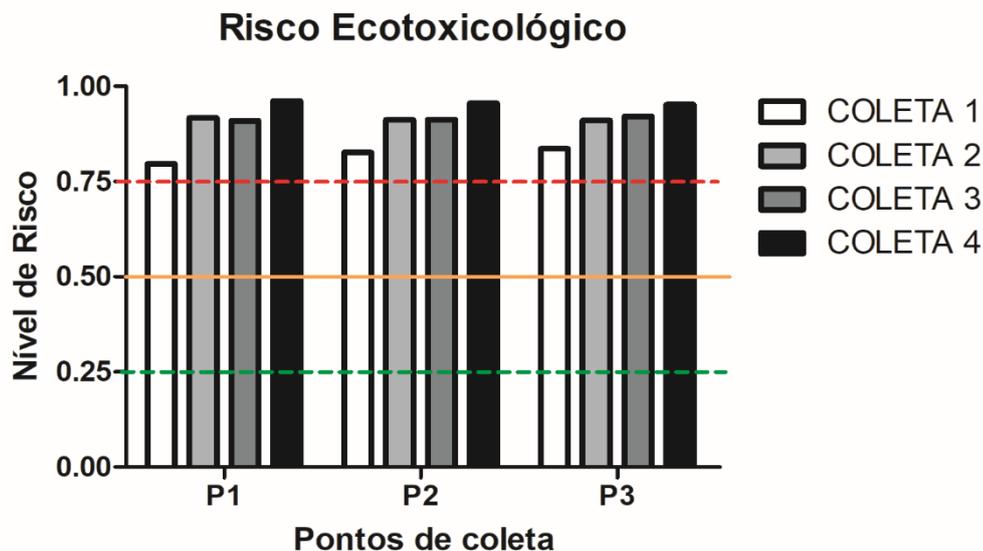
Figura 20: Ensaios ecotoxicológicos realizados com *O. niloticus* nos pontos P₁, P₂ e P₃, indicando a frequência de micronúcleos nas amostras quando comparado ao P₀ e ao controle (*).



4.4.2. Risco Ecotoxicológico

O risco ecotoxicológico foi calculado com base nos resultados obtidos durante a realização dos ensaios ecotoxicológicos com *R. subcapitata*, *C. dubia*, *O. niloticus* e *S. cerevisiae* através dos ensaios YES para verificação de efeito de desregulação endócrina.

Figura 21: Risco Ecotoxicológico referente às amostras coletadas nos pontos amostrais P₁, P₂ e P₃ na sub-bacia do Rio João Mendes, Niterói – RJ.



Legenda: 0,00–0,25 = risco inexistente; >0,25–0,50 = risco moderado; >0,50–0,75 = risco alto; >0,75 = risco extremo (JENSEN & MESMAN 2006 *apud* MENDES, 2016). Linha pontilhada verde: início da faixa de risco moderado; Linha contínua laranja: início da faixa de risco alto; Linha pontilhada vermelha: início da faixa de risco extremo.

Assim como ocorreu para o risco químico, o P₀ não entrou no gráfico de risco ecotoxicológico para os organismos utilizados durante os ensaios pois foi utilizado como ponto de referência.

O menor risco ecotoxicológico observado para o P₁ foi de 0,80 e o maior atingiu 0,96. Para o P₂, o menor risco foi de 0,83 e o maior foi de 0,91. Para o P₃, o menor risco calculado foi de 0,84, contra 0,95 na coleta realizada em setembro/2017. Em todos os casos, o risco ecotoxicológico foi classificado como extremo, assim como aconteceu com o risco químico.

Raphidocelis subcapitata

Durante as quatro coletas de amostragem foi possível verificar que as amostras do P₀ não possuíram efeitos tóxicos sobre esses organismos. No entanto, efeitos de toxicidade crônica foram observados durante as 4 coletas de amostragem para os pontos P₁, P₂ e P₃, os quais durante os mesmos períodos apresentaram níveis de fósforo e amônia muito acima dos limites máximos permitidos pela legislação brasileira.

Embora não seja possível atribuir os efeitos tóxicos crônicos observados para os pontos P₁, P₂ e P₃ durante as 4 coletas de coleta por se tratarem de amostras ambientais e que por tanto, são misturas complexas de uma diversidade de compostos, alguns estudos apontam para o efeito sobre a biota de alguns deles.

Por exemplo, o nitrato, juntamente com o íon amônio são as principais fontes de nitrogênio utilizadas pelos produtores primários (ESTEVEZ, 1998). Por esse motivo, sua presença em corpos hídricos tende a provocar estímulo ao crescimento da biomassa desses indivíduos, como foi observado nos pontos P₁, P₂ e P₃ durante as coletas 1 e 2. O que corrobora a hipótese de que a análise isolada de um único composto não pode justificar os efeitos crônicos em amostras ambientais é o fato de que, mesmo que a NH₃⁺ tenha se mantido em níveis elevados em todas as coletas, foi observada uma redução no crescimento de *R. subcapitata* durante as coletas 3 e 4. Essa diferença provavelmente se deve à presença ou ainda à ausência de algum composto ou mistura de compostos durante o mesmo período, que podem estar fora do grupo de substâncias analisadas neste trabalho.

Outro composto também essencial para os produtores primários é o fosfato. Além de ser um dos compostos limitantes para a produtividade primária, ele está associado ao armazenamento de energia na forma de ATP e GTP, por exemplo, além de fazer parte da composição química de ácidos nucleicos, fosfolipídios, fosfoproteínas, dentre outros (ESTEVEZ, 1998). Por isso, sua presença em concentrações mais elevadas em corpos hídricos propicia o desenvolvimento da biomassa de algas, como foi observado nos pontos P₁, P₂ e P₃ durante as coletas 1 e 2. Mas, assim como a presença de amônia, sua presença por si só é incapaz de justificar os padrões de crescimento e toxicidade encontrados para as amostras ambientais analisadas, por existirem diversos outros compostos que não foram estudados e que podem estar presentes influenciando nesses padrões de forma isolada ou como parte da ação de uma mistura de compostos.

Alguns estudos realizados indicam que microalgas são mais sensíveis à presença de antibióticos do que microcrustáceos e peixes, por exemplo (YANG *et al*, 2008). Um estudo realizado em 2008 por Yang e colaboradores indicou

que a combinação trimetropim-sulmonamidas (como sulfametoxazol, por exemplo), provoca efeitos sinérgicos sobre as microalgas, que inibem sucessivas etapas de produção de folato. Esse composto participa da fotorespiração, que produzirá glicina que ao chegar às mitocôndrias será oxidada para a realização da fotossíntese (LIMA *et al*, 2003). Por esse motivo, espera-se que situações que alterem os padrões normais de produção de folato, possam interferir na realização da fotossíntese e conseqüentemente na multiplicação celular vegetal. Sendo assim, embora durante as coletas 1 e 2 tenha se observado um aumento na produção de biomassa vegetal mesmo que em presença desses dois compostos, é provável que a redução da produção vegetal observada nas coletas 3 e 4 possa ser, em parte, devido à presença desses fármacos.

Ceriodaphnia dubia

Para as amostras coletadas nas três coletas referentes ao P₀ não foi observado efeito crônico sobre os organismos quando comparados ao ensaio controle. No entanto, para os pontos P₁, P₂ e P₃ foram observados efeitos tóxicos agudos durante os ensaios realizados nas 3 coletas amostrais.

Resultados similares foram obtidos por Schroder e colaboradores, por exemplo, em um estudo realizado em 2008 para avaliar os efeitos tóxicos de efluentes municipais. Eles estudaram os efeitos tóxicos de efluentes municipais utilizando como bioindicadores duas espécies de microcrustáceos (*C. dubia* e *D. magna*) e obtiveram 100% de mortalidade em *C. dubia*, enquanto *D. magna* se mostrou menos sensível à amostra analisada, indicando que em um ambiente natural, *C. dubia* poderia ser mais facilmente afetada por menores alterações nas condições físico-químicas, assim como outras espécies tão ou mais sensíveis.

Nos pontos amostrais onde foram verificados os efeitos tóxicos agudos foram encontrados valores de fósforo e amônia acima do permitido pela RC 357/05 durante as 4 coletas amostrais, o que provavelmente teve efeito sobre a mortalidade dos indivíduos.

Outro parâmetro que, embora não tenha seu limite máximo fixado legalmente, mas que pode ter influenciado na sobrevivência desses organismos, foram os sólidos totais. A *C. dubia* é uma espécie filtradora e por esse motivo, teores elevados de sólidos totais podem acarretar em efeitos tóxicos sobre esses indivíduos (NETO, 2009). Os valores de ST observados para os pontos P₁, P₂ e P₃ superam os valores observados para o P₀ em 4x, em média, e essa diferença somada aos demais fatores pode ter sido um dos potenciais motivos para a morte dos indivíduos observada.

O que corrobora essas hipóteses é o fato da amostra controle e do P₀ estarem com valores de amônia e fósforo dentro dos limites aceitáveis durante a realização de todas as coletas, o que provavelmente reduziu o seu potencial tóxico sobre os microcrustáceos.

Em relação às substâncias químicas de interesse, seguindo os limites de PNEC observados pelos órgãos ambientais da Noruega, Canadá e União Europeia, foram encontrados níveis de sulfametoxazol acima do limite máximo de efeito não observado (0,118 µg/L) nos 3 pontos amostrais que apresentaram toxicidade durante a realização das 3 coletas em que foram realizados os ensaios com *C. dubia*. E, embora as concentrações de trimetropim e ibuprofeno tenham se mantido dentro dos limites sugeridos (16 e 20 µg/L, respectivamente) para os três pontos amostrais, os níveis de BPA superaram os 0,175 µg/L determinados pela EU na coleta 2 para o P₂ e o P₃ e na coleta 4 para P₁, P₂ e P₃.

Com base na definição de PNEC, é esperado que as substâncias que se encontram em concentrações superiores a ele apresentem potencial tóxico agudo sobre os organismos aquáticos, especialmente para aqueles mais sensíveis, como é o caso das algas e dos microcrustáceos. Sendo assim, acredita-se que os efeitos agudos observados possam ser explicados pelos níveis de contaminantes observados, além dos fatores físico-químicos fora das faixas permitidas e da presença de outras substâncias ou mistura de substâncias não avaliadas nesse estudo com igual ou maior potencial tóxico.

Oreochromis niloticus

Durante as 4 coletas amostrais foi possível verificar que as amostras coletadas no P₀ não apresentaram efeitos tóxicos sobre os peixes utilizados nos ensaios ecotoxicológicos, quando comparado aos resultados obtidos no grupo controle, ou seja, grupo que não foi exposto às amostras ambientais coletadas.

Nos ensaios realizados durante as coletas 1, 2, 3 e 4, os pontos P₁, P₂ e P₃ apresentaram efeitos tóxicos crônicos sobre os organismos, evidenciados por uma frequência de micronúcleos bem superior à observada para o P₀. A toxicidade verificada provavelmente está associada à presença de misturas complexas de compostos químicos das mais variadas classes, incluindo os fármacos alvo deste estudo.

Além disso, concentrações elevadas de Bisfenol A detectadas nos ensaios referentes às coletas 1 e 4, para o P₁, P₂ e P₃ e na coleta 3 para P₂ e P₃, podem ajudar a explicar a elevada frequência de micronúcleos nos organismos expostos às amostras referentes a esses pontos. Diversos estudos realizados com peixes mostram que o BPA pode provocar deformidades nos embriões, hemorragia e anormalidades no desenvolvimento em concentrações superiores a 100 µg/l, além de inibir o crescimento dos machos, quando expostos por um longo período a concentrações variando entre 640 e 1280 µg/l de amostra (KANG *et al*, 2007). Ainda em peixes, foram encontradas anomalias cromossômicas utilizando-se a análise da frequência de micronúcleos de células sanguíneas para exposições a doses de 50 µg/kg e uma diminuição no número de ovos produzidos (KANG *et al*, 2007).

YES

O P₀ não apresentou o efeito de citotoxicidade durante os ensaios em nenhuma das 4 coletas amostrais e seu EQ-E2 foi significativamente menor do que aqueles observados nas amostras dos pontos P₁, P₂ e P₃.

Os níveis máximos de EQ-E2 observados para o P₁, P₂ e P₃ coincidiram com as maiores concentrações de BPA encontradas nesses pontos amostrais. Pelo fato do BPA ser um desregulador endócrino com potencial de mimetizar a atividade estrogênica de hormônios naturais e sintéticos, acredita-se que ele

seja em boa parte responsável pelos efeitos observados (GHISELLI & JARDIM, 2007). Além disso, existem diversos outros hormônios naturais que ocorrem em efluentes domésticos e que não foram analisados durante esse estudo e que podem contribuir, como por exemplo, o estradiol, estriol, estrona e o 17- β -estradiol e ainda o hormônio sintético EE2, alvo de análise nesse estudo. O EE2 é o principal hormônio sintético, sendo consumido através de pílulas anticoncepcionais e é mais estável na água do que os hormônios naturais, apresentando também alto potencial estrogênico (FERREIRA, 2008).

Sun e colaboradores (2008) *apud* Ferreira (2008) avaliaram as concentrações de equivalentes 17- β estradiol em afluentes de uma ETE na China utilizando o ensaio YES e obtiveram 15,7 ng/L como resposta. No presente estudo, as concentrações de equivalentes estradiol variaram entre 17,4 e 43,9 ng/L no P₁, 35,7 e 57,9 ng/L no P₂ e 14,8 e 38,0 ng/L no P₃, valores consideravelmente superiores ao observado para uma ETE, o que corrobora a hipótese de que os EQ-E2 elevados encontrados são consequência do lançamento de efluentes *in natura* nos corpos hídricos pertencentes à sub-bacia do Rio João Mendes.

4.5. Risco Ambiental Integrado (Análise de Risco Ecológico)

O risco ambiental integrado de cada ponto amostral em cada coleta foi calculado com a integração dos riscos das linhas de evidência química e ecotoxicológica (figura 22).

Seguindo-se as premissas utilizadas como base para a aplicação de pesos diferenciados para cada linha de evidência, foi aplicado o mesmo peso (peso 1) para cada uma das LoEs trabalhadas, pois os resultados observados para o risco ecotoxicológico foi condizente com o observado para o risco químico, ou seja, ambos foram classificados como extremo e não havia nenhuma espécie de especial interesse a ser protegida no local estudado.

Como P₀ foi utilizado como referência de base para o cálculo do risco químico e do risco ecotoxicológico, não foi calculado o risco integrado para ele.

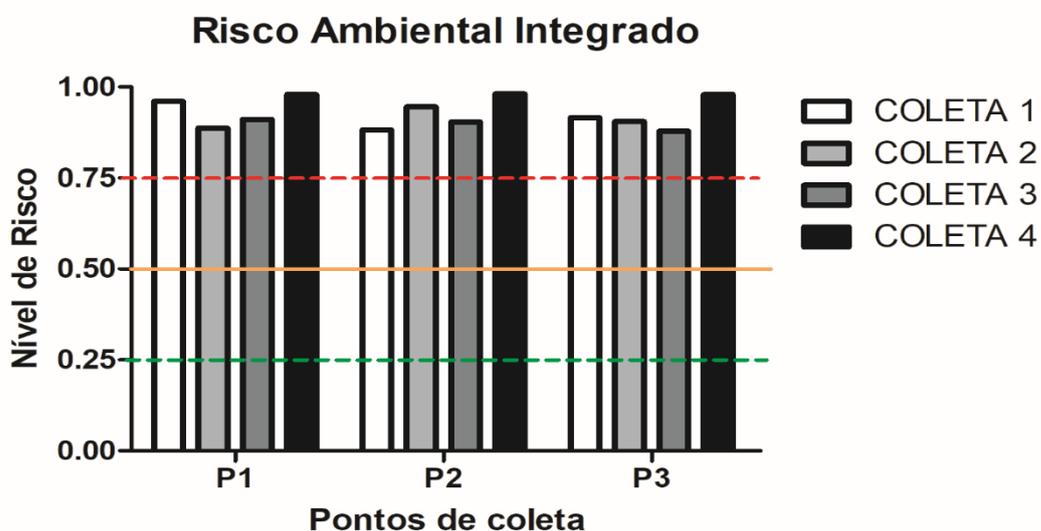
No entanto, o risco dos três pontos restantes, P_1 , P_2 e P_3 , foi de aproximadamente 0,98, um nível de risco classificado como extremo.

Integrando-se as duas LoE foi possível observar que não há um padrão de variação do risco entre os pontos amostrais, sendo eles muito variáveis ao longo das coletas. O risco para o P_1 diminuiu da coleta 1 para a coleta 2 e aumentou novamente até a coleta 4, na qual atingiu seu maior valor, assim como ocorreu no P_3 , porém neste a variação foi menor entre uma coleta e outra.

No P_2 , no entanto, houve aumento do risco da coleta 1 para a coleta 2, uma pequena redução da coleta 2 para a coleta 3 e um novo aumento na coleta 4, atingindo também o maior risco calculado para esse ponto amostral.

Em todos os casos, o nível de risco se manteve acima de 0,75, ou seja, foi considerado extremo para os três pontos amostrais, durante as 4 coletas de coleta, o que não é o esperado para áreas naturais, já que de acordo com Jensen & Mesman (2006), o nível de risco esperado para essas áreas seria de 0,00-0,25.

Figura 22: Risco Ambiental Integrado referente às amostras coletadas nos pontos amostrais P_1 , P_2 e P_3 na sub-bacia do Rio João Mendes, Niterói – RJ.



Legenda: 0,00–0,25 = risco inexistente; >0,25–0,50 = risco moderado; >0,50–0,75 = risco alto; >0,75: risco extremo (JENSEN & MESMAN 2006 *apud* MENDES, 2016).
 Linha pontilhada verde: início da faixa de risco moderado, Linha contínua laranja: início da faixa de risco alto; Linha pontilhada vermelha: início da faixa de risco extremo.

5. CONCLUSÃO

O modelo de ARE escolhido mostrou ser uma ferramenta eficaz e robusta na avaliação da situação de degradação dos corpos hídricos localizados em áreas urbanizadas, indicando risco ambiental extremo à sub-bacia do Rio João Mendes, decorrente da presença de SQI lançadas principalmente por meio de efluentes domésticos.

O ponto amostral P_0 não apresentou diferença significativa quando comparado aos controles específicos dos ensaios de ecotoxicologia, e apresentou baixas concentrações das SQI e dos parâmetros de físico-químicos analisados. Com isso, pode ser utilizado como ponto de referência no cálculo das LoE e da ARE para os 3 pontos de monitoramento (P_1 , P_2 e P_3).

Os 3 pontos amostrais apresentaram Risco extremo ($>0,75$) em todas as coletas para ambas LoE (química e Ecotoxicológica), assim como no Risco Ecológico Integrado ($P_1 > 0,89$, $P_2 > 0,88$ e $P_3 > 0,88$). Os maiores riscos foram verificados nos pontos onde ocorreram as maiores concentrações de Bisfenol A e sulfametoxazol.

A escolha das SQI para a LoE química na avaliação de risco ecológico foi eficaz, visto que a variação nas suas concentrações nos 3 pontos amostrais das 4 coletas foi determinante para as diferenças encontradas dentro da faixa de risco extremo da LoE química.

Os organismos utilizados nos ensaios ecotoxicológicos foram capazes de expressar os impactos provocados pelas alterações ambientais decorrentes da presença de determinadas substâncias, indicando que o corpo hídrico em questão apresenta risco extremo à biota.

REFERÊNCIAS

- ABNT. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Planejamento de amostragem de efluentes líquidos e corpos receptores - NBR 9897. Rio de Janeiro, Brasil: [s.n.], 1987.
- ABNT. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Procedimentos para preservação e preparo de amostras a serem utilizadas em ensaios ecotoxicológicos – NBR 15469. Rio de Janeiro, Brasil: [s.n.], 2007.
- ABNT. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, A. Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com algas (Chlorophyceae) - NBR 12648. Rio de Janeiro, Brasil: [s.n.], 2011.
- ABNT. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, A. Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com *Ceriodaphnia spp* (Crustacea, Cladocera). 5 ed. NBR 13373. Rio de Janeiro, Brasil: [s.n.], 2017.
- ABRAHÃO, Raphael. Impactos do lançamento de efluentes na qualidade da água do riacho Mussuré. 2006. 140 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Desenvolvimento e Meio Ambiente, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2006.
- ABREU, M. J. *et al.* The use of PCR-RFLP to genetically distinguish the morphologically close species: *Ceriodaphnia dubia* Richard, 1894 and *Ceriodaphnia silvestrii* Daday, 1902 (Crustacea Cladocera). Brazilian Journal of Biological Sciences, [s.i.], v. 70, n. 1, p.121-124, 28 fev. 2010.
- ADAMS, S. M. & GREELEY, M. S. Ecotoxicological indicators of water quality: using assess the health of aquatic ecosystems. Water, Air, and Soil Pollution, v. 123, p. 103–115, 2000.
- AL-QAIM, Fouad F. *et al.* Investigation of the environmental transport of human pharmaceuticals to surface water: a case study of persistence of pharmaceuticals in effluent of sewage treatment plants and hospitals in Malaysia. Journal Of The Brazilian Chemical Society, [s.i.], p.1124-1135, 2015.
- AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS. GUIA NACIONAL: Guia Nacional de Coleta e Preservação de Amostras: Água, Sedimento, Comunidades Aquáticas e Efluentes Líquidos. 2 ed. Brasília, Df: Athalaia Gráfica e Editora, 2011. 327 p. Disponível em: <<http://arquivos.ana.gov.br/>>. Último acesso em: 21/01/2018.
- APHA/ AWWA /WEF.EATON, A.D *et al.* Standard methods for the examination of water and wastewater. 22^a ed. Washington: American Public Health Association. 1360 p. (2012).
- ARENSBERG, Pia; HEMMINGSEN, Vicky H.; NYHOLM, Niels. A miniscale algal toxicity test. Chemosphere, Great Britain, v. 30, n. 11, p.2103-2115, 15 fev. 1995.

- ARIAS, A. R. L. *et al.* Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 12, n. 1, p. 61–72, 2007.
- ARUOJA, Villem. *Algae Pseudokirchneriella subcapitata* in environmental hazard evaluation of chemicals and synthetic nanoparticles. 2011. 114 f. Tese (Doutorado) - Curso de Philosophy In Environmental Protection, Estonian University Of Life Sciences, Tartu, 2011.
- BAPTISTA, Ivana Eunice. Avaliação da toxicidade de efluentes gerados em uma indústria têxtil catarinense. 2001. 156 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.
- BARROS, Ana Angélica Monteiro de. Análise Florística e Estrutural do Parque Estadual da Serra da Tiririca, Niterói e Maricá, RJ, Brasil. 2008. 213 f. Tese (Doutorado) - Curso de Botânica, Escola Nacional de Botânica Tropical, Rio de Janeiro, 2008.
- BASTOS, Renata Viviane. Estudo da Degradação do Antibiótico Sulfametoxazol em Solução Aquosa por Fotólise. 2012. 98 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.
- BILA, M. D.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. *Química Nova*. vol. 30, n. 3, p. 651-666, 2007.
- BOLOGNESI, C. & HAYASHI, M. Micronucleus assay in aquatic animals. *Mutagenesis*, v. 26, n. 1, p. 205–213, 2011.
- BORGES, F. H. & TACHIBANA, W. K. A evolução da preocupação ambiental e seus reflexos no ambiente dos negócios: uma abordagem histórica. Porto Alegre: Abepro, 2005. 8 p. Encontro Nacional de Engenharia de Produção, 25., 2005, Porto Alegre.
- BRAGA, Felipe F.; AFONSO, Anice Esteves. Diagnóstico das alterações na Bacia do Rio João Mendes, Niterói, RJ: gerados pelo crescimento urbano desordenado. In: Simpósio Brasileiro de Geografia Física Aplicada, 10., 2003, Rio de Janeiro. Artigo. Rio de Janeiro: Geo Uerj, 2003. p. 1064 - 1076.
- BRASIL. Lei Federal nº 6.938, de 31 de agosto de 1981. Dispõe sobre A Política Nacional do Meio Ambiente, Seus Fins e Mecanismos de Formulação e Aplicação, e Dá Outras Providências. Brasília, 31 ago. 1981.
- BRASIL, Resolução CONAMA nº20, de 18 de junho de 1986. Classificação de águas, doces, salobras e salinas do Território Nacional. Publicado no D.O.U. 1986.
- BRASIL. Constituição (1988). Constituição da República Federativa do Brasil. Brasília, DF: Senado Federal: Centro Gráfico, 1988. 292 p.
- BRASIL. Resolução ANVISA nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia Para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. Brasília, DF.

- BRASIL, Resolução CONAMA nº357, de 17 de março de 2005. Classificação de águas, doces, salobras e salinas do Território Nacional. Publicado no D.O.U. 2005.
- BRASIL, Resolução CONAMA nº 420, de 30 de dezembro de 2009. Critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas. Publicado no D.O.U. 2009.
- BRASIL, Resolução CONAMA nº 430, de 13 de maio de 2011. Condições e padrões de lançamento de efluentes. Publicado no D.O.U. 2011.
- BRESSOLA, Roni Cesar. Avaliação de Toxicidade de Mananciais em Áreas Degradadas pela Mineração com a Utilização do Bioindicador *Scenedesmus subspicatus* e Implementação de Metodologia de Toxicidade com Peixe *Danio rerio* popular Zebrafish. 2007. 84 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia Ambiental, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 2007.
- BRIX, Rikke et al. Evaluation of the suitability of recombinant yeast-based estrogenicity assays as a pre-screening tool in environmental samples. *Environment International*, [s.l.], v. 36, n. 4, p.361-367, maio 2010.
- BÜCKER, A.; CONCEIÇÃO, B.. Genotoxicity evaluation of tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to waters from two sites of Itajaí-Açu River (SC, Brazil). *Journal of The Brazilian Society of Ecotoxicology*, [s.l.], v. 7, n. 2, p.51-56, 5 dez. 2012.
- CAMPOS, Bruno Galvão de. Avaliação do risco ecológico de metais em sedimentos da Baía de Guanabara (RJ), através de um método escalonado baseado em múltiplas linhas de evidências. 2017. 73 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biodiversidade Aquática, Universidade Estadual Paulista, São Vicente, SP, 2017.
- CANADA. 2008. Environment Canada, Health Canada. Screening Assessment for the Challenge Phenol, 4,4' (1-methylethylidene)bis- (Bisphenol A) CAS 80-05-7. October 2008.
- CARRASCO, Kenneth R.; TILBURY, Karen L.; MYERS, Mark S. Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. *Canadian Journal of Fisheries And Aquatic Sciences*, [s.i.], v. 47, p.2123-2136, 15 maio 1990.
- CAVAŞ, T. & ERGENE-GÖZÜKARA, S. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. *Aquatic toxicology* (Amsterdam, Netherlands), v. 74, n. 3, p. 264–71, 2005.
- CERDA, Blas; OLIVE, Jonh H. Effects of diet on seven-day *Ceriodaphnia dubia* toxicity tests. *Ohio Journal of Science*, Ohio, v. 93, n. 3, p.44-47, jun. 1993
- CHAO, Iara Regina Soares. Remoção de Fósforo de Efluentes de Estações de Tratamento Biológico de Esgotos Utilizando Lodo de Estação de

- Tratamento de Água. 2006. 160 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
- CHAPMAN, Peter M.; MCDONALD, Blair G.; LAWRENCE, Gary S. Weight-of-Evidence Issues and Frameworks for Sediment Quality (And Other) Assessments. *Human And Ecological Risk Assessment: An International Journal*, [s.l.], v. 8, n. 7, p.1489-1515, out. 2002.
- CHAPMAN, P. M. & HOLLERT, H. Should the sediment quality triad become a tetrad, a pentad, or possibly even a hexad? *Journal of Soils and Sediments*, v. 6, n. 1, p. 4–8, 2006.
- CHAVES, Kélen Siqueira. Determinação dos desreguladores endócrinos bisfenol-A, β -estradiol, 17α -etinilestradiol e estrona no Rio Paraíba do Sul. 2016. 134 f. Tese (Doutorado) - Curso de Biotecnologia Industrial, Universidade de São Paulo, Lorena, 2016.
- CHRISTOFOLETTI, Cintya Aparecida. Avaliação dos potenciais citotóxico, genotóxico e mutagênico das águas de um ambiente lêntico, por meio dos sistemas-teste de *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus*. 2008. 129 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP, 2008.
- CLEUVERS, M. Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicology Letters*, [s.l.], v. 142, n. 3, p.185-194, 15 maio 2003.
- CLEUVERS, Michael. Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid. *Ecotoxicology And Environmental Safety*, [s.l.], v. 59, n. 3, p.309-315, nov. 2004.
- CLUBBS, Rebekah L.; BROOKS, Bryan W.. *Daphnia magna* responses to a vertebrate estrogen receptor agonist and an antagonist: A multigenerational study. *Ecotoxicology And Environmental Safety*, [s.l.], v. 67, n. 3, p.385-398, jul. 2007.
- ECHA. EUROPEAN CHEMICALS AGENCY. European Union Risk Assessment Report, Information on chemicals, 2008.
- ESTEVES, F. D. A. Fundamentos de Limnologia. Interciência, Rio de Janeiro, n. 2^a, 1998
- EXPÓSITO, Nora *et al.* Performance of *Raphidocelis subcapitata* exposed to heavy metal mixtures. *Science of the Total Environment*, [s.l.], v. 601-602, p.865-873, dez. 2017.
- FAY, E. F.; SILVA, C. M. M. de S. Índice do Uso Sustentável da Água (ISA-ÁGUA) - Região do Submédio São Francisco. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna/SP, 2006, pp. 158.
- FENT, K; A WESTON,; CAMINADA, D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology*, [s.l.], v. 76, n. 2, p.122-159, 10 fev. 2006.
- FERREIRA, M. G. M. Remoção da atividade estrogênica de 17β -Estradiol e de 17α - Etinilestradiol pelos processos de ozonização e O₃ / H₂O₂. 2008.

- 192 p. Tese (Doutorado em Ciências em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- FERREIRA, Tatiana Corrêa. Análise espaço-temporal do uso e cobertura do solo da Bacia Hidrográfica da Região Oceânica de Niterói-RJ: Subsídio ao Planejamento e Gestão Ambiental. 2010. 138 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Gestão Ambiental. Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2010.
- FONTENELLE, Thiago Henriques; CORRÊA, Wanderson Barreto. Impactos da urbanização no espelho d'água dos sistemas lagunares de Itaipu e de Piratininga, Niterói (RJ), entre 1976 e 2011. Boletim de Geografia, [s.l.], v. 32, n. 2, p.150-157, 3 dez. 2014. Universidade Estadual de Maringá.
- FURTADO, C. M.; VON MÜHLEN, C. Endocrine disruptors in water filters used in the Rio dos Sinos Basin region, Southern Brazil. Brazilian Journal of Biology, v. 75, p. 85–90, 2015.
- GALVÃO, Renata dos Santos. Drenagem urbana e planejamento ambiental: vale do Rio João Mendes (Niterói/RJ). 2008. 80 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Geografia, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2008.
- GASPAROTTO, Felipe Augusto. Avaliação Ecotoxicológica e Microbiológica da Água de Nascentes Urbanas no Município de Piracicaba-SP. 2011. 89 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.
- GHISELLI, Gislaine; JARDIM, Wilson F.. Interferentes endócrinos no ambiente. Química Nova, [s.l.], v. 30, n. 3, p.695-706, fev. 2007
- GIORI, Jacqueline Zardo. Análise dos efeitos de despejos acidentais de poluentes em corpos hídricos usando traçadores fluorescentes - estudo de caso: bacia do Rio Guandu / RJ. 2011. 132 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Civil, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.
- GOLOUBKOVA, Tatiana; SPRITZER, Poli Mara. Xenoestrogênios: o Exemplo do Bisfenol-A. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia, [s.l.], v. 44, n. 4, p.323-330, ago. 2000.
- GOMES, Jeane Kury Nobre. Avaliação quantitativa de risco ecológico inerente a derramamentos de hidrocarbonetos no arquipélago de Fernando de Noronha. 2013. 132 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia de Produção, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.
- GRISOLIA, Cesar Koppe. A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides. Mutation Research/genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, [s.l.], v. 518, n. 2, p.145-150, jul. 2002.
- GUIMARÃES, Victor Hugo Silva. Impacto de cobre, zinco e níquel sobre leveduras isoladas de áreas de mineração e regiões do entorno de Sabará - MG. 2016. viii, 42 f., il. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Ciências Ambientais) - Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

- HAILING-SØRENSEN, B.; NYHOHN, N.; BAUN, A.. Algal toxicity tests with volatile and hazardous compounds in air-tight test flasks with CO₂ enriched headspace. *Chemosphere*, [s.l.], v. 32, n. 8, p.1513-1526, abr. 1996.
- HALLGREN P. 2009. Strategies for Monitoring of Endocrine Disrupting Chemicals in Aquatic Environment. 96. Tese de Doutorado. Departamento de Química Analítica. Lund University, Lund, Suécia.
- HEBERER, Thomas. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicology Letters*, [s.l.], v. 131, n. 1-2, p.5-17, maio 2002.
- HOBOLD, Valdir. Avaliação de metodologias para análise toxicológica utilizando algas do tipo *Scenedesmus subspicatus* e *Daphnia magna*. 2007. 104 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia Ambiental, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 2007.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <<https://ww2.ibge.gov.br>> Consultado em: 08/05/2017
- International Conference on Harmonisation (ICH); Validation of Analytical Procedures: Methodology, Q2B (CPMP/ICH/281/95), 1995;
- Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO); Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos, DOQ-CGCRE-008, 2003.
- JENSEN, J. & MESMAN, M. Ecological Risk Assessment of Contaminated Land, RIMV, 2006.
- KACZALA, F.; SALOMON, P.; MARQUES, M.; GRANÉLI, E.; HOGLAND, W. Effects from log-yard stormwater runoff on the microalgae *Scenedesmus subspicatus*: Intra-storm magnitude and variability. *Journal of Hazardous Materials (Print)*, v. 185, p. 732-739, 2011.
- KANG, Jeong-hun; AASI, Daisuke; KATAYAMA, Yoshiki. Bisphenol A in the Aquatic Environment and Its Endocrine-Disruptive Effects on Aquatic Organisms. *Critical Reviews In Toxicology*, [s.l.], v. 37, n. 7, p.607-625, jan. 2007.
- KOLLURU, R. V. & BROOKS, D. G. Evaluación de riesgos integrada y administración estratégica. In: KOLLURU, R.V.; BARTELL, S. M; PITBLADO, T.M.; STRICOFF, R.S. (Ed.). Manual de evaluación y administración de riesgos. McGraw-Hill, 1998.
- KRISHNAN, A. V.. Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology*, [s.l.], v. 132, n. 6, p.2279-2286, 1 jun. 1993.
- KUMAR, Sarangi Pradipta. Micronucleus assay: a sensitive indicator for aquatic pollution. *International Journal Of Research In Biosciences*, [s.l.], v. 1, n. 2, p.32-37, out. 2012.
- LEITE, Alfredo Estevão de Barros. Simulação do lançamento de esgotos domésticos em rios usando um modelo de qualidade d'água,

- SisBAHIA®. 2004. 94 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Saúde Pública, Fiocruz, Rio de Janeiro, 2004.
- LIMA, J.A.; CATHARINO, R.R.; GODOY, H.T. Folatos em vegetais: importância, efeito do processamento e biodisponibilidade. *Alimentos e Nutrição*, Araraquara, v.14, n.1, p.123-129, 2003.
- LIMA, Diego Roberto Sousa et al. Fármacos e desreguladores endócrinos em águas brasileiras: ocorrência e técnicas de remoção. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, [s.l.], v. 22, n. 6, p.1043-1054, dez. 2017.
- LINDQVIST, Niina; TUHKANEN, Tuula; KRONBERG, Leif. Occurrence of acidic pharmaceuticals in raw and treated sewages and in receiving waters. *Water Research*, [s.l.], v. 39, n. 11, p.2219-2228, jun. 2005.
- LONG, E. R. & CHAPMAN, P. M. A Sediment Quality Triad: Measures of sediment contamination, toxicity and infaunal community composition in Puget Sound. *Marine Pollution Bulletin*, v. 16, n. 10, p. 405–415, 1985.
- MARTINS, Daniel Von Rondon. Avaliação ecotoxicológica de efluentes de celulose branqueada de eucalipto ao longo do tratamento biológico. 2008. 85 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Civil, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, RJ, 2008.
- MASTERS, Julie A. et al. Validation of a four-day *Ceriodaphnia* toxicity test and statistical considerations in data analysis. *Environmental Toxicology and Chemistry*, [s.l.], v. 10, n. 1, p.47-55, jan. 1991.
- MELO, Cláudia Lucas Corrêa. Aspectos ecológicos da alimentação do boto cinza, *Sotalia guianensis*, na Baía de Guanabara, Rio de Janeiro: comparações intra e interespecíficas. 2010. 105 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Oceanografia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.
- MENDES, Sandra Valéria Buratini. Efeitos do meio de cultivo sobre a sobrevivência, reprodução e sensibilidade de *Ceriodaphnia dubia*. 2002. 104 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Ambiental, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2002.
- MENDES, Juliane Constantino. Caracterização dos efluentes líquidos, em termo de ecotoxicidade, gerados nas disposições de RSU nos aterros do entorno de Criciúma-SC. 2004. 84 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia Ambiental, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 2004.
- MENDES, Maíra Peixoto. Avaliação de risco ecológico em área alagada contaminada por gasolina. 2016. 178 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Ambiental, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.
- MINES, R. O.; LACKEY, W. L. Introduction to Environmental Engineering. First Edit ed. [s.l.] Prentice Hall PTR, 2009.

- MINISTÉRIO DAS CIDADES. Diagnóstico dos Serviços de Água e Esgotos. 19ª Edição, 2015.
- MONTEIRO-NETO, Cassiano *et al.* Associações de peixes na região costeira de Itaipu, Niterói, RJ. Iheringia. Série Zoologia, [s.l.], v. 98, n. 1, p.50-59, mar. 2008.
- MOREIRA, C. B. et al. Genotoxicity and histological alterations in grey mullet *Mugil liza* exposed to petroleum water-soluble fraction (PWSF). Environmental science and pollution research international, v. 21, n. 8, p. 5565–74, 2014.
- MOREIRA, Carolina Gomes. Avaliação da presença de metilparabeno e propilparabeno no ambiente aquático e seus potenciais estrogênicos e a toxicidade aguda. 2014. 116 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Ambiental, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.
- MOUNT, D. I.; NORBERG, T. J..A seven-day life cycle cladoceran toxicity test. Environmental Toxicology And Chemistry, [s.l.], v. 3, n. 3, p.425-434, jul. 1984.
- NETO, Antônio Carlos Nogueira. Avaliação de Toxicidade Aguda e Crônica em Águas do Rio Jundiá e em Afluentes e Efluentes da ETE Novo Horizonte, Jundiá, São Paulo. 2009. 75 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências em Tecnologia Nuclear, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- NIEMEYER, J. C.; SILVA, E. M. DA. & SOUSA, J. P. Desenvolvimento de um Esquema para Avaliação de Risco Ecológico em Ambientes Tropicais: Estudo de Caso da Contaminação por Metais em Santo Amaro da Purificação, Bahia, Brasil. Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology, v. 2, p. 263–267, 2007.
- NIEMEYER, J. C. et al. Environmental risk assessment of a metal-contaminated area in the Tropics. Tier I: Screening phase. Journal of Soils and Sediments, v. 10, n. 8, p. 1557–1571, 2010.
- NITERÓI/AGRAR. EIA. Estudo de Impacto Ambiental – Corredor Viário TransOceânica. AGRAR Consultoria e Estudos Técnicos Ltda, 2014.
- NITERÓI/AGRAR. RIMA. Relatório de Impacto Ambiental – Corredor Viário TransOceânica.
- AGRAR Consultoria e Estudos Técnicos Ltda., 2014.
- NITERÓI. Lei nº 1157, de 04 de fevereiro de 1992. Institui o Plano Diretor de Niterói. Niterói, RJ.
- NITERÓI. Lei nº 1968, de 05 de abril de 2002. Institui o Plano Urbanístico da Região Oceânica, dispendo sobre diretrizes gerais, políticas setoriais, zoneamento ambiental, ordenação do uso e da ocupação do solo e aplicação de instrumentos de política urbana na região.. Niterói, RJ.

- NITERÓI. Lei Ordinária nº 2874, de 13 de dezembro de 2011. Considera patrimônio cultural de natureza imaterial a pesca artesanal de Itaipu. Niterói, RJ.
- NORUEGA, Initial assessment of eleven pharmaceuticals using the EMEA guideline in Norway. Oslo, 2006.
- ORIS, James T.; WINNER, Robert W.; MOORE, Marianne V.. A four-day survival and reproduction toxicity test for *Ceriodaphnia dubia*. Environmental Toxicology and Chemistry, [s.l.], v. 10, n. 2, p.217-224, fev. 1991.
- PAKRASHI, Sunandan *et al.* *Ceriodaphnia dubia* as a potential bio-indicator for assessing acute aluminum oxide nanoparticle toxicity in fresh water environment. Plos One, [s.l.], v. 8, n. 9, p.1-13, 5 set. 2013.
- PAVLIĆ, Želimira; VIDAKOVIĆ-CIFREK, Željka; PUNTARIĆ, Dinko. Toxicity of surfactants to green microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata* and *Scenedesmus subspicatus* and to marine diatoms *Phaeodactylum tricornutum* and *Skeletonema costatum*. Chemosphere, [s.l.], v. 61, n. 8, p.1061-1068, dez. 2005.
- PEREIRA, L.P.F.; MERCANTE, C.T.J. A amônia nos sistemas de criação de peixes e seus efeitos sobre a qualidade da água. Revisão. Boletim do Instituto de Pesca, São Paulo, v.31, n.1, p. 81-85, 2005.
- PIRATOBA, Alba Rocio Aguilar *et al.* Caracterização de parâmetros de qualidade da água na área portuária de Barcarena, PA, Brasil. Ambiente e Agua - an Interdisciplinary Journal of Applied Science, [s.l.], v. 12, n. 3, p.435-456, 2 maio 2017.
- POJANA, Giulio *et al.* Estrogenic potential of the Venice, Italy, lagoon waters. Environmental Toxicology and Chemistry, [s.l.], v. 23, n. 8, p.1874-1880, 2004.
- RA, Jin-sung *et al.* Occurrence of estrogenic chemicals in South Korean surface waters and municipal wastewaters. J. Environ. Monit., [s.l.], v. 13, n. 1, p.101-109, 2011.
- RAIMUNDO, Cassiana Carolina Montagner. Contaminantes emergentes em água tratada e seus mananciais: sazonalidade, remoção e atividade estrogênica. 2011. 203 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.
- REGINATTO, Valéria. Avaliação do ensaio de toxicidade com a alga *Scenedesmus subspicatus* para o estudo de efluentes industriais. 1998. 137 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1998.
- REIS, José Antônio Tosta dos; MENDONÇA, Antônio Sérgio Ferreira. Análise técnica dos novos padrões brasileiros para amônia em efluentes e corpos d'água. Engenharia Sanitária e Ambiental, [s.l.], v. 14, n. 3, p.353-362, set. 2009.
- RIBANI, Marcelo *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. Química Nova, [s.l.], v. 27, n. 5, p.771-780, out. 2004.

- RIO DE JANEIRO (Estado). Decreto nº 44417, de 01 de outubro de 2013. Cria a Reserva Extrativista Marinha de Itaipu no Município de Niterói e dá Outras Providências.
- ROCHESTER, Johanna R.. Bisphenol A and human health: a review of the literature. *Reproductive Toxicology*, [s.l.], v. 42, p.132-155, dez. 2013.
- RODRIGUES, Lúcia Helena Ribeiro. Avaliação da sensibilidade de *Raphidocelis subcapitata* (chlorococcales, chlorophyta) ao sulfato de cobre e sulfato de zinco através de testes de toxicidade crônica e determinação da densidade algas por espectrofotometria. 2002. 96 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ecologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.
- RODRIGUES, M.s.; RAYA-RODRIGUEZ, M.t.m. Análise de risco ecológico com o uso do bioindicador *Lolium multiflorum*. *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*, [s.l.], v. 7, n. 1, p.9-13, 7maio 2012.
- ROJÍČKOVÁ, Renata; MARŁÁLEK, Blahoslav. Selection and sensitivity comparisons of algal species for toxicity testing. *Chemosphere*, [s.l.], v. 38, n. 14, p.3329-3338, jun. 1999.
- ROSA, Gustavo Almeida Borges. Estudo dos efeitos do fármaco propranolol para *Ceriodaphnia silvestrii* (cladocera, crustacea) com ênfase em efeitos nas populações. 2008. 161 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2008.
- ROUTLEDGE, Edwin J.; SUMPTER, John P.. Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environmental Toxicology and Chemistry*, [s.l.], v. 15, n. 3, p.241-248, mar. 1996.
- SALOMÃO, André Luís de Sá. Ecosistema engenheirado no tratamento descentralizado de águas residuárias de pequenos geradores: a engenharia ecológica na Ilha Grande, RJ. / André Luís de Sá Salomão. – 2009. 96 f.
- SALOMÃO, André Luís de Sá; MARQUES, Marcia. Quantification of alkali-labile phosphate groups in the plasma of *Oreochromis niloticus* exposed to intermittent discharges of oestrogens: effect of concentration vs. load. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, [s.l.], v. 94, n. 11, p.1161-1172, 2 set. 2014a.
- SALOMÃO, André Luís de Sá; MARQUES; SOROLDONI, Sanye; MARQUES, Marcia; HOGLAND, William; Bila, Daniele Maia. Effects of Single and Mixed Estrogens on Single and Combined Cultures of *D. subspicatus* and *P. subcapitata*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 93, p. 215–221. 2014b.
- SALOMÃO, André Luís de Sá; MARQUES, Marcia. Estrogenicity and genotoxicity detection in different contaminated waters. *Human and Ecological Risk Assessment: an International Journal*, [s.l.], v. 21, n. 7, p.1793-1809, 2 dez. 2015.

- SALOMÃO, André Luís de Sá. Ocorrência e ecotoxicidade de desreguladores endócrinos químicos em ambientes aquáticos e em sistemas de tratamento de esgoto. 2014. 101 f. Tese (Doutorado) - Curso de Meio Ambiente, Linnaeus University, Kalmar, 2014.
- SALVADOR, Marcus Vinicius S.; SILVA, Maria Augusta M. da. Morphology and sedimentology of the Itaipu Embayment - Niterói/RJ. Anais da Academia Brasileira de Ciências, [s.l.], v. 74, n. 1, p.127-134, mar. 2002.
- SAMPLE, B. E. et al. Recommendations to improve wildlife exposure estimation for development of soil screening and cleanup values. Integrated Environmental Assessment and Management, v. 10, n. 3, p. 372–87, 2014.
- SANCHEZ-GALAN, S.; LINDE, AR.; GARCIA-VAZQUEZ, E.. Brown trout and European minnow as target species for genotoxicity tests: Differential sensitivity to heavy metals. Ecotoxicology and Environmental Safety, [s.l.], v. 43, n. 3, p.301-304, jul. 1999.
- SANCHEZ, L. A. Análise de risco ecológico para o diagnóstico de impactos ambientais em ecossistemas aquáticos continentais tropicais. Escola de Engenharia de São Carlos, 2012.
- SCHRODER, Gene D.; ROSS- LEWANDOWSKI, Shirley; DAVIS, Ernst M.. Evaluation of the toxic effects of selected municipal wastewater effluents on aquatic invertebrates. Environmental Technology, [s.l.], v. 12, n. 9, p.757-768, set. 1991.
- SEA - Secretaria de Estado do Ambiente. Estudo técnico para a criação de Reserva Extrativista Marinha de Itaipu - RESEX Itaipu. 2013
- SFT. Initial assessment of eleven pharmaceuticals using the EMEA guideline in Norway.641 Statens forurensningstilsyn (SFT), Strømsveien, Norway, 2006.
- SILVA, Giselle Gomes Moreira da. Avaliação da qualidade de águas superficiais e de sedimentos quanto à toxicidade e atividade estrogênica. 2015. 119 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Ambiental, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.
- SPONCHIADO, Graziela et al. Genotoxic effects in erythrocytes of *Oreochromis niloticus* exposed to nanograms-per-liter concentration of 17 β -estradiol (E2): an assessment using micronucleus test and comet assay. Water, Air, & Soil Pollution, [s.l.], v. 218, n. 1-4, p.353-360, 12 out. 2010.
- SOUZA, N, F. O; NETO, J. L. S. Caracterização do potencial poluidor por salões de beleza em Palmas -TO. Disponível em: <<http://www.catolica-to.edu.br>>.
- SOUZA, Neyliane Costa de. Avaliação de micropoluentes emergentes em esgotos e águas superficiais. 2011. 183 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Civil, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.
- TALLINI, Karin. Metodologia de avaliação de risco ecológico em ambiente aquático a partir de evidências químicas, biológicas e

- ecotoxicológicas. 2010. 115 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ecologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.
- TALLINI, K. et al. Estabelecimento de protocolo de avaliação de risco ecológico em ambiente aquático tendo o programa de monitoramento do rio Jacuí, São Jerônimo (RS). *Journal of the Brazilian society of ecotoxicology*, [s.l.], v. 7, n. 1, p.55-63, 7 maio 2012.
- TANG, J. Y. M. et al. Mixture effects of organic micropollutants present in water: Towards the development of effect-based water quality trigger values for baseline toxicity. *Water Research*, v. 27, p. 3300–3314, 2013.
- TRAINOR, Francis R.; CAIN, Jerome R.; SHUBERT, L. Elliot. Morphology and nutrition of the colonial green alga *Scenedesmus*: 80 years later. *The Botanical Review*, [s.l.], v. 42, n. 1, p.5-25, jan. 1976.
- TSAI, Wen-tien. Human health risk on environmental exposure to bisphenol-A: a Review. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*, [s.l.], v. 24, n. 2, p.225-255, dez. 2006.
- TUKAJ, Zbigniew; BOHDANOWICZ, Jerzy. Diesel fuel oil induced morphological changes in some *Scenedesmus* species. *Algological Studies*, Stuttgart, v. 77, p.83-94, jul. 1995.
- UFMG. Biblioteca Digital. Belo Horizonte, Universidade Federal de Minas Gerais,. 2016. Disponível em: <http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/handle/1843/MPBB-.6ZQERE/captulo0hidroquimica.pdf?sequence=9>
- UNIÃO EUROPÉIA, Decisão de Execução (UE) 2015/495 da comissão de 20 de março de 2015. Estabelece uma lista de vigilância das substâncias para monitorização a nível da União no domínio da política da água nos termos da Diretiva 2008/105/CE do Parlamento Europeu e do Conselho. Bruxelas, 2015.
- US EPA. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Special Report on Environmental Endocrine Disruption: Effects Assessment and Analysis. Washington, D.C. US, 1997.
- VERSTEEG, DJ. *et al.* *Ceriodaphnia* and *Daphnia*: a comparison of their sensitivity to xenobiotics and utility as a test species. *Chemosphere*, [s.l.], v. 34, n. 4, p.869-892, fev. 1997.
- VIEIRA, V.T. (2003) Efeitos do Crescimento Urbano sobre os Canais: Drenagem do Rio Paquequer, Teresópolis – RJ. Rio de Janeiro: Dissertação de Mestrado, Programa de Pós Graduação em Geografia/UFRJ.
- WASSERMAN, Júlio C.; ALVES, Albano R.. O holismo aplicado ao conhecimento ambiental. *Engevista*, Niterói, v. 6, n. 3, p.113-120, dez. 2004.
- WINNER, Robert W. Evaluation of the relative sensitivities of 7-D *Daphnia magna* and *Ceriodaphnia dubia* toxicity tests for cadmium and sodium pentachlorophenate. *Environmental Toxicology and Chemistry*, [s.l.], v. 7, n. 2, p.153-159, fev. 1988.

- YAMAGISHI, Takahiro et al. Cell reproductive patterns in the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata* (= *Selenastrum capricornutum*) and their variations under exposure to the typical toxicants potassium dichromate and 3,5-DCP. Plos One, [s.l.], v. 12, n. 2, p.1-12, 2 fev. 2017.
- YANG, Li-Hua et al. Growth-inhibiting effects of 12 antibacterial agents and their mixtures on the freshwater microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*. Environmental toxicology and chemistry, [s.l.], v. 27, n. 5, p.1201-1208, 2008.

Lista de Apêndices

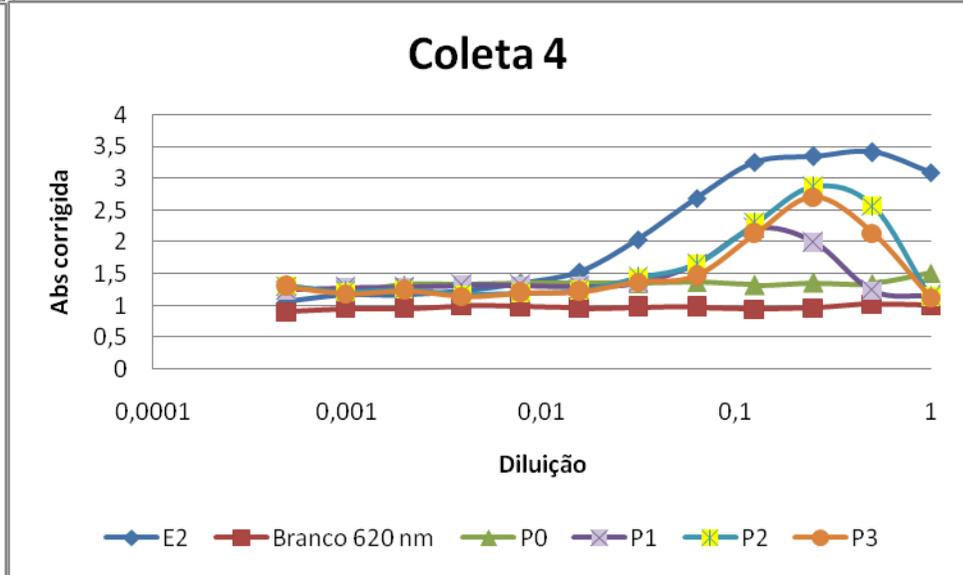
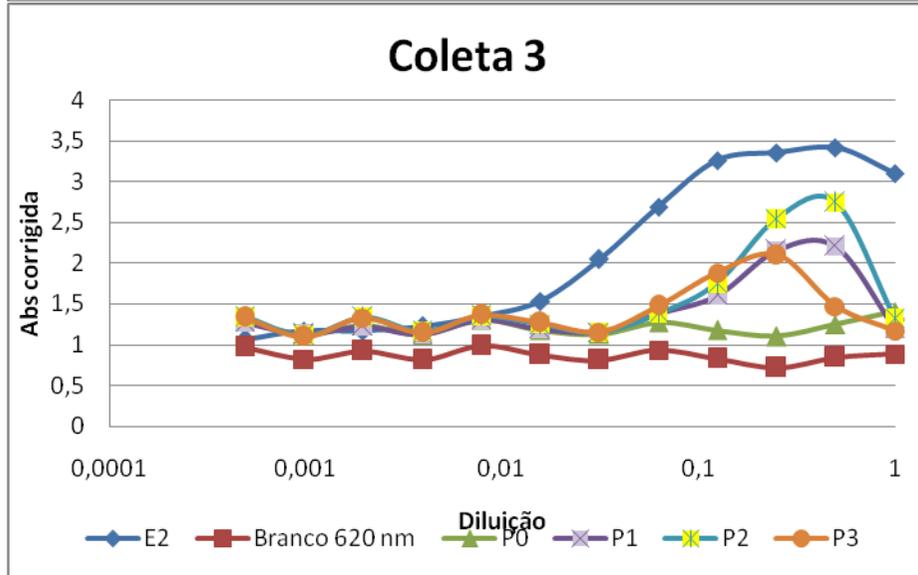
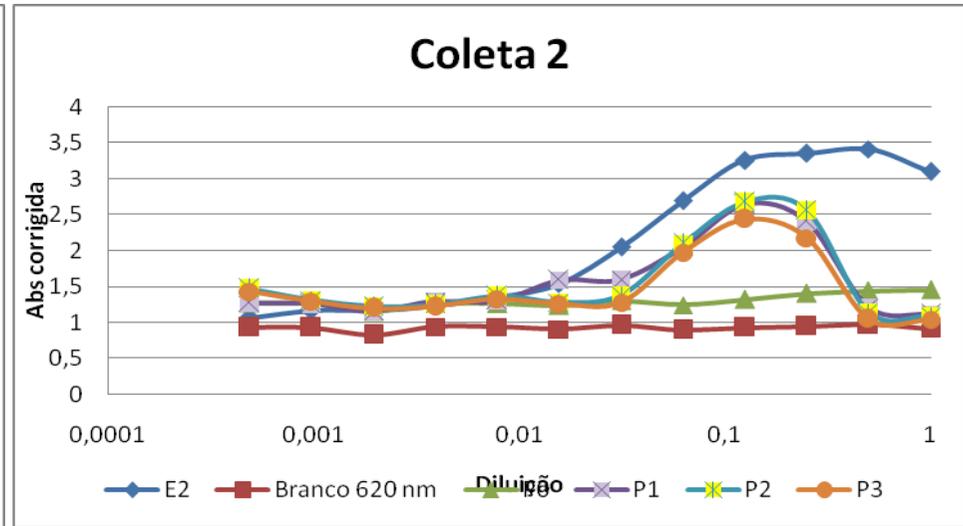
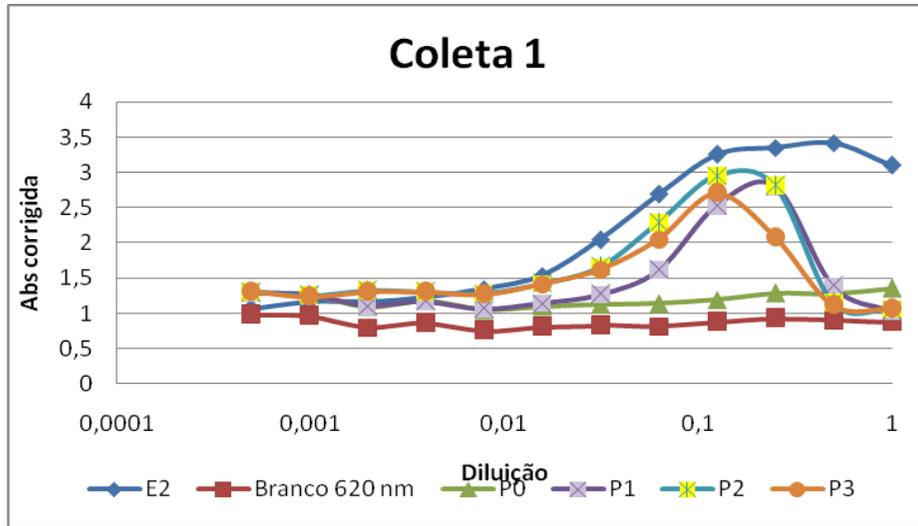
Apêndice A – Resultados dos ensaios ecotoxicológicos de avaliação da atividade estrogênica YES com as amostras de água coletada do Rio João Mendes, Niterói – RJ, durante as 4 coletas, ocorridas nos meses de março, maio, julho e setembro/ 2017.

Apêndice B – Cromatograma referente a análise das 5 substâncias químicas de interesse (SQI) realizados com a amostra de água P₀ da coleta 4 coletada do Rio João Mendes, Niterói – RJ. Ponto controle com baixa intensidade de sinal para as 5 SQI.

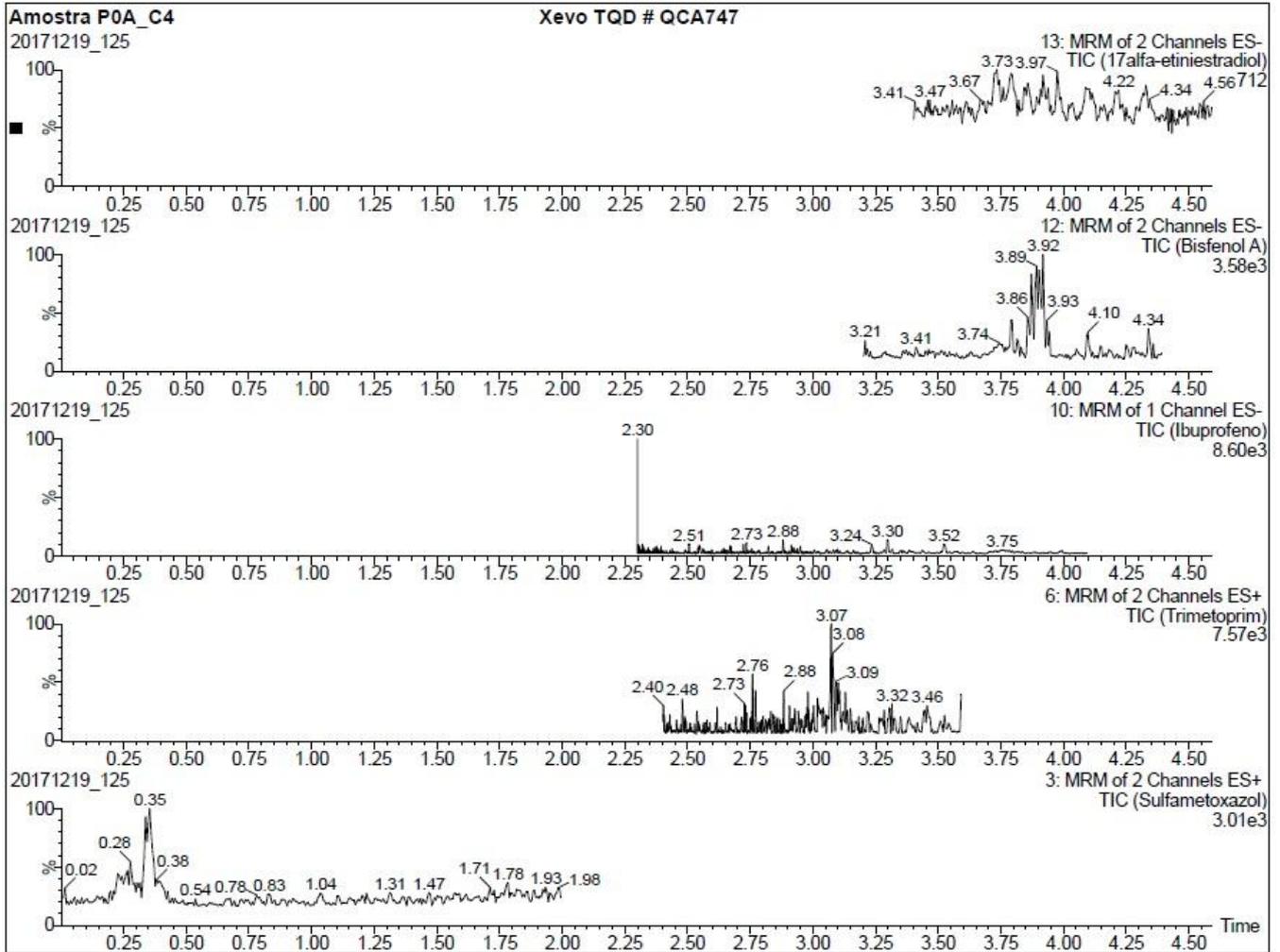
Apêndice C – Cromatograma referente a análise das 5 substâncias químicas de interesse (SQI) realizados com a amostra de água P₂ da coleta 4 coletada do Rio João Mendes, Niterói – RJ.

APÊNDICES

APÊNDICE A: YES com as amostras de água coletada do Rio João Mendes, Niterói – RJ, durante as 4 coletas de coleta, ocorridas nos meses de março, maio, julho e setembro/ 2017.



Apêndice B – Cromatograma referente a análise das 5 substâncias químicas de interesse (SQI) realizados com a amostra de água P₀ da coleta 4 coletada do Rio João Mendes, Niterói – RJ. Ponto controle com baixa intensidade de sinal para as 5 SQI.



Apêndice C – Cromatograma referente a análise das 5 substâncias químicas de interesse (SQI) realizados com a amostra de água P₂ da coleta 4 coletada do Rio João Mendes, Niterói – RJ.

