



CETESB

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL

**AVALIAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DA TOXICIDADE CRÔNICA
NO CANAL DE FUGA II (CFUG 02900)**

OUTUBRO DE 2007



FICHA TÉCNICA BIBLIOGRÁFICA

DOCUMENTO

<i>Tipo</i>	<i>Data</i>	<i>Origem</i>	<i>Nº Página / V</i>	<i>Nº Mapas</i>
Relatório Técnico	Out/2007			

TÍTULO DO DOCUMENTO

Avaliação e Identificação da Toxicidade Crônica no Canal de Fuga II (Ponto CFUG 02900)

AUTOR RESPONSÁVEL

Assinatura / Carimbo / Data

AUTORES / ENTIDADES OU UNIDADES A QUE PERTENCEM

Sandra Valéria Buratini (EAHE)
Márcia Aparecida Aragão (EAHE)

DOCUMENTO AUTORIZADO POR

Assinatura / Carimbo / Data

DOCUMENTO REVISADO

Assinatura / Carimbo / Data

CLASSIFICAÇÃO DE SEGURANÇA

Externa Interna

Reservada

PALAVRAS CHAVES

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

CÓDIGO E TÍTULO DO PROJETO

OS 42.200.300 – Operação dos Atuais Sistemas de Avaliação da Qualidade de Águas Superficiais do Estado de São Paulo.

DISTRIBUIÇÃO INTERNA

Áreas / Nº de Cópias

EAHE (1); EAH (1); EEQI (1); ARDB (2).

USO DA BIBLIOTECA

Classificação de Assunto

Nº Documento

Visto / Carimbo / Data

CETESB – C

Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental – Sede: Av. Prof. Frederico Hermann Jr., 345 – CEP 05459-900 – São Paulo – SP – Tel.: (0xx11) 3030-6000, Fax: (0xx11) 3030-6402 – Telex.: 1183053 - C.N.P.J. n.º 43.776.491/0001 – 70 – Insc. Est. n.º 109.091.375-118 – Insc. Munic. n.º 8.030.313-7 - Site.: www.cetesb.sp.gov.br

TÍTULO DO DOCUMENTO

Avaliação e Identificação da Toxicidade Crônica no Canal de Fuga II (CFUG 02900).

RESUMO

Dando continuidade aos Estudos de Avaliação e identificação da Toxicidade em águas superficiais de pontos da rede de Monitoramento do Estado de São Paulo, iniciou-se a implantação dos procedimentos destinados à identificação da toxicidade crônica. Para tanto, entre 2006 e 2007 foram efetuados 5 experimentos com amostras coletadas no ponto CFUG 02900 (Canal de Fuga II da Usina Henry Borden, Cubatão), onde tem-se registrado efeito tóxico crônico a *Ceriodaphnia dubia* desde 2004.

As manipulações da Fase I que promoveram remoção dos efeitos tóxicos foram filtração em membrana de 1 µm e extração em fase sólida, apontando o material particulado, constituído predominantemente por cianofíceas, como responsável pela toxicidade. A aplicação dos procedimentos da Fase II (filtração em membrana de 0,45 µm e centrifugação) confirmaram tais organismos como agentes tóxicos suspeitos, já que cianobactérias podem inibir a sobrevivência e/ou reprodução desse microcrustáceo tanto por interferência mecânica, como pela produção de substâncias tóxicas.

OBSERVAÇÕES



COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL

SUMÁRIO

1-INTRODUÇÃO	2
2-MATERIAL E MÉTODOS	3
2.1. Identificação do local de coleta	3
2.2. Amostras	3
2.3. Água de diluição	3
2.4. Organismos-teste	4
2.5. Testes de toxicidade crônica.....	4
2.6. Procedimentos para Avaliação e Identificação da Toxicidade Crônica.....	4
2.6.1. Fase I ou fase de caracterização	4
2.6.1.1. Teste de toxicidade base	4
2.6.1.2. Teste com adições de EDTA (ácido etilenodiaminotetracético)	4
2.6.1.3. Teste com adições de Na ₂ S ₂ O ₃ (tiosulfato de sódio).....	5
2.6.1.4. Teste de toxicidade com filtração da amostra	5
2.6.1.5. Teste de toxicidade com aeração da amostra.....	5
2.6.1.6. Teste com extração em fase sólida	5
2.6.1.7. Análise estatística.....	5
2.6.2. FASE II.....	6
2.6.2.1. Filtração em membrana de fibra de vidro de 1µm de porosidade	6
2.6.2.2. Extração em fase sólida	6
2.6.2.3. Filtração em membrana de nitrato de celulose de 0,45 µm de porosidade	7
2.6.2.4. Centrifugação	7
2.6.2.5. Extração das membranas	7
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	7
4- CONCLUSÃO.....	12
5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	12



COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL

1-INTRODUÇÃO

Da mesma forma que nos procedimentos voltados à identificação da toxicidade aguda, os estudos para identificação da toxicidade crônica também envolvem a divisão da amostra em alíquotas, as quais são submetidas a manipulações específicas, seguidas da realização de testes de toxicidade crônica. Entretanto, neste caso, a Fase I ou fase de caracterização, envolve duas etapas: a primeira inclui testes com filtração, aeração, graduação de pH, extração em fase sólida, seguida da eluição com um solvente, adição de EDTA e tiosulfato de sódio, efetuados apenas no pH inicial da amostra. A segunda etapa envolve a execução de algumas manipulações (aeração, filtração, extração em fase sólida) combinadas com ajustes do pH da amostra para 3,0 e 10,0. Esta segunda etapa, normalmente não é necessária, sendo aplicada quando as manipulações da primeira não indicam padrões claros sobre a natureza do agente tóxico (USEPA, 1991a).

Por sua vez, a execução dos testes crônicos com o microcrustáceo *Ceriodaphnia dubia* também exigiu a avaliação de algumas modificações sugeridas no protocolo USEPA (1991a), verificando sua compatibilidade com as condições disponíveis no laboratório. Tais alterações incluíram:

- (a) redução do volume de solução-teste por béquer;
- (b) redução do período de teste em
- (c) decorrência da utilização de organismos com 3 dias de idade para início do mesmo;
- (d) redução do número de réplicas;
- (e) redução do número de concentrações-teste.

Neste relatório são apresentados os resultados obtidos com a implantação de tal metodologia, utilizando amostras coletadas no ponto situado no Canal de Fuga II, o qual recebe as águas do Reservatório Rio das Pedras (Complexo Billings). Devido aos altos teores de fósforo total e clorofila a, as águas desse ponto apresentaram um aumento do grau de trofia, passando de mesotróficas (2003) a hipereutróficas (2004) e supereutróficas (2005). Nesse mesmo período, o IVA (Índice de Preservação da Vida Aquática) correspondente ao ponto manteve o enquadramento na classe Ruim, devido aos resultados dos testes de toxicidade crônica com *Ceriodaphnia dubia*: de 18 amostras coletadas neste ponto entre Fevereiro de 2003 e Dezembro de 2005, somente uma (5,5%) não apresentou toxicidade ao microcrustáceo; 16 (89%) determinaram efeito crônico e uma (5,5%) efeito agudo (CETESB, 2004; CETESB, 2005 e CETESB, 2006). Tal frequência é indicativa de que a toxicidade é consistente, conforme recomendado para a realização de estudos de avaliação e identificação da toxicidade (USEPA, 1991a).



2-MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Identificação do local de coleta

O ponto CFUG 02900 da Rede de Monitoramento, localiza-se no Canal de Fuga II da Usina Hidrelétrica Henry Borden (município de Cubatão, São Paulo), na saída da turbina externa. Assim, as águas do Reservatório Billings (já contaminadas por esgoto sanitário) chegam à usina, e, após passarem pelas turbinas para geração de energia, são lançadas no Canal de Fuga II, desaguando no Rio Cubatão (Figura 1).

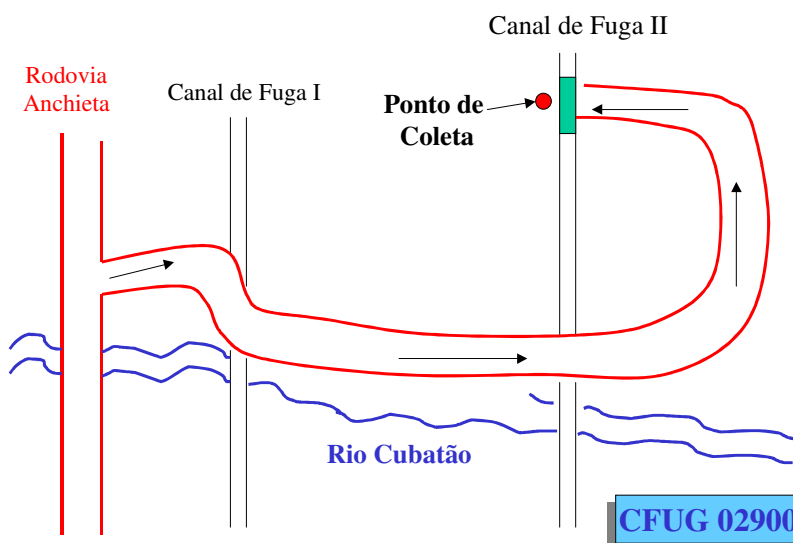


Figura 1: Croqui com a localização do ponto CFUG 02900.

2.2. Amostras

Em cada campanha foram coletados 6 a 10 litros de amostra, preservados nas condições descritas na norma ABNT-NBR 13373 (2005). Foram efetuadas 5 amostragens, sendo a primeira (Maio/2006), independente dos programas de monitoramento da CETESB. Nas demais campanhas (Agosto, Outubro e Dezembro/2006 e Fevereiro/2007), os experimentos foram realizados com amostras coletadas dentro do Programa da Rede de Monitoramento de Qualidade das Águas Superficiais, de modo a se dispor de uma série de dados de parâmetros físicos, químicos e biológicos, que poderiam subsidiar a interpretação dos resultados obtidos neste estudo.

2.3. Água de diluição

Como controle, para preparo das soluções-teste e preparo dos brancos das manipulações das amostras, utilizou-se a água de cultivo de *C. dubia* no EAHE, ou seja, água do Reservatório de Ribeirão do Pirai.



COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL

2.4. Organismos-teste

Em um experimento preliminar, com o objetivo de reduzir o volume de amostra necessário, bem como os custos operacionais, eliminou-se uma renovação utilizando-se jovens com 3 dias de idade para início dos ensaios. Contudo, a possibilidade de alteração dos resultados devido à utilização de organismos maiores, possivelmente mais resistentes, fez com que nos ensaios definitivos fossem utilizados organismos-jovens com 6-30 horas de idade, conforme previsto na norma ABNT-NBR 13373 (2005).

2.5. Testes de toxicidade crônica

Os ensaios ecotoxicológicos com *Ceriodaphnia dubia* seguiram os procedimentos descritos na Norma ABNT-NBR 13373 (2005), exceção feita ao número de réplicas por concentração, o qual foi reduzido para 5, conforme definido em ensaios preliminares. É importante mencionar que nestes, avaliou-se, também, a utilização de 10 ml de solução-teste por réplica (ao invés de 15 ml, conforme previsto no procedimento de referência). Contudo, verificou-se que com tal redução de volume, há possibilidade de desaparecimento total da amostra por evaporação, o que pode implicar na perda de dados.

2.6. Procedimentos para Avaliação e Identificação da Toxicidade Crônica

2.6.1. Fase I ou fase de caracterização

Cada alíquota de amostra foi submetida à respectiva manipulação de uma só vez, sendo preservada sob refrigeração e utilizada para o preparo das soluções-teste a cada renovação das mesmas.

2.6.1.1. Teste de toxicidade base

Destina-se a determinar a toxicidade da amostra bruta e deve ser repetido sempre que testes com manipulações da amostra são iniciados. O resultado obtido nestes testes, quando comparado aos resultados dos testes com a amostra manipulada, permitem identificar quais tratamentos reduzem ou eliminam os efeitos tóxicos da mesma. Além disso, permitem avaliar mudanças da toxicidade decorrentes do armazenamento da amostra.

No teste base, são definidas 3 ou 4 concentrações que devem ser utilizadas em todos os testes da fase de caracterização.

2.6.1.2. Teste com adições de EDTA (ácido etilenodiaminotetracético)

É utilizado para verificar se os efeitos tóxicos são decorrentes da presença de certos metais catiônicos na amostra, uma vez que o EDTA é capaz de formar complexos não tóxicos com alguns destes metais. Assim, esta manipulação consistiu na preparação de duas séries de diluições da amostra, adicionando-se volumes de uma solução-estoque de EDTA de modo a obter uma concentração final de 3,0 mg/L na primeira série e de 8,0 mg/L na segunda.



2.6.1.3. Teste com adições de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (tiosulfato de sódio)

Destinam-se a detectar a presença de compostos oxidantes (cloro, por exemplo) e, também, de alguns metais, uma vez que o tiosulfato de sódio tem a propriedade de reduzir a toxicidade dos mesmos. De modo semelhante ao EDTA, esta manipulação incluiu a preparação de duas séries de diluições da amostra, seguida da adição de volumes de uma solução estoque de tiosulfato de sódio de modo a atingir uma concentração final de 10 mg/L na primeira série e de 25 mg/L na segunda.

2.6.1.4. Teste de toxicidade com filtração da amostra

Para verificar se a toxicidade poderia ser atribuída a sólidos filtráveis, uma alíquota de água de diluição foi filtrada em membrana de fibra de vidro de 1 μm . A mesma foi coletada, reservando-se uma parte para o branco do teste da filtração e outra para o branco do teste com extração em fase sólida. Em seguida, uma alíquota da amostra foi filtrada, coletando-se uma parte para efetuar o teste relativo à filtração e o restante para o teste com extração em fase sólida.

2.6.1.5. Teste de toxicidade com aeração da amostra

Nesta manipulação, voltada à detecção de compostos voláteis ou oxidáveis, uma alíquota de amostra e outra de água de diluição foram transferidas para provetas e submetidas à aeração durante 60 minutos. Após esse período, a aeração foi suspensa e amostra e água de diluição (correspondente ao branco) foram removidas dos recipientes com auxílio de pipetas volumétricas, para realização do teste de toxicidade.

2.6.1.6. Teste com extração em fase sólida

Esta manipulação destina-se a determinar se a toxicidade da amostra deve-se a ocorrência de compostos orgânicos não polares. Assim, uma alíquota de água de diluição e 1 litro de amostra anteriormente filtradas em membrana de fibra de vidro de 1 μm , foram passadas por uma coluna de octadecil de 6 ml, previamente condicionada pela passagem de metanol e água desionizada. Este procedimento foi repetido com uma segunda coluna e as alíquotas de amostra pós-coluna foram combinadas para a realização de testes de toxicidade. Posteriormente, efetuou-se a eluição das colunas com metanol, realizando-se testes de toxicidade com os eluatos, também combinados.

2.6.1.7. Análise estatística

Os dados dos testes de toxicidade crônica foram analisados pelo método de Interpolação Linear, disponível no Programa ICPIN (NORBERG-KING, 1993). Este calcula a concentração que causa a redução de uma determinada porcentagem na resposta do organismo, além do respectivo intervalo de confiança. No presente estudo, o nível de inibição utilizado foi 25%, por ser sugerido em USEPA (1991a) como o equivalente à CENO (maior concentração da amostra em que não são observados efeitos).

O intervalo de confiança, quando calculável, foi utilizado para verificar se havia diferença significativa entre os resultados obtidos no teste base e os registrados nos testes com a



COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL

amostra após as diferentes manipulações. Para tanto, aplicou-se a seguinte fórmula, proposta em USEPA (1985):

$$G = \sqrt{(\log(LS_{(1)} \div CI25_{(1)}))^2 + (\log(LS_{(2)} \div CI25_{(2)}))^2}$$

onde:

LS₍₁₎ = Limite superior do intervalo de confiança referente ao teste 1;

LS₍₂₎ = Limite superior do intervalo de confiança referente ao teste 2;

CI25₍₁₎ = Concentração de inibição referente ao teste 1;

CI25₍₂₎ = Concentração de inibição referente ao teste 2.

Então, calculou-se:

$$H = 10^G$$

$$Z = CI25 \text{ superior} \div CI25 \text{ inferior}$$

Se $Z > H$: existe diferença significativa entre os valores de CI25.

Na impossibilidade de aplicar tal fórmula (ausência do intervalo de confiança, por exemplo), calculou-se a razão entre a CI25 obtida no teste base e a CI25 obtida no ensaio com a alíquota da amostra manipulada, considerando-se uma manipulação efetiva na remoção dos efeitos tóxicos quando o quociente foi superior a 2 - fator considerado normal e aceitável para variabilidade em testes de toxicidade, segundo CHAPMAN (2000).

2.6.2. FASE II

Tanto as técnicas de fracionamento, como as análises químicas pertinentes à fase II, são definidas em função dos resultados obtidos na fase de caracterização. Portanto, neste estudo, esta etapa envolveu os procedimentos destinados à identificação dos agentes tóxicos removidos por filtração.

2.6.2.1. Filtração em membrana de fibra de vidro de 1µm de porosidade

Nesta manipulação, membrana e sistema de filtração foram previamente condicionados pela passagem de água desionizada com pH 3,0, para remoção de possíveis resíduos de metais. Em seguida, foram filtrados os volumes de água de diluição (branco) e amostra necessários aos testes de toxicidade relativos a este procedimento e, também, à extração em fase sólida e/ou à filtração em membrana de nitrato de celulose de 0,45 µm.

2.6.2.2. Extração em fase sólida

Utilizando uma coluna de octadecil de 1000 mg (6 ml de capacidade), pré-condicionada pela passagem de metanol e água desionizada, filtrou-se, inicialmente, o volume de água



de diluição necessário ao branco do teste de toxicidade. Em seguida, foram preparados os brancos da eluição, mediante a passagem de dois volumes das soluções de metanol/água, progressivamente menos polares (75%, 80%, 85%, 90%, 95% e 100%), os quais foram coletados em frascos apropriados.

Após o condicionamento da coluna com metanol 100% e água desionizada, passaram-se 1000 ml de amostra, coletando-se duas alíquotas de 300 ml da mesma, após a passagem de 200 ml e 700 ml. Seguiu-se a eluição da coluna com dois volumes sucessivos das seguintes soluções de metanol/água 75%, 80%, 85%, 90%, 95% e 100%. Este procedimento foi repetido com uma segunda coluna, combinando-se os brancos da eluição e os eluatos e mantendo-se os brancos e as alíquotas de amostras separados para a realização dos ensaios com *Ceriodaphnia dubia*.

2.6.2.3. Filtração em membrana de nitrato de celulose de 0,45 µm de porosidade

A água de diluição (branco) e a amostra, já filtradas em membrana de 1µm, foram filtradas nesta outra membrana, previamente condicionada pela passagem de água desionizada.

2.6.2.4. Centrifugação

Trata-se de um procedimento adicional, para verificar se a redução da toxicidade deve-se à volatilização que pode ocorrer durante o processo de filtração. Neste procedimento, a amostra foi centrifugada em alta velocidade (10.000 rpm) durante 30 minutos, coletando-se o sobrenadante para a realização do teste de toxicidade.

2.6.2.5. Extração das membranas

Conforme descrito em USEPA (1993), a extração do material retido pelas membranas deve ser efetuada com um solvente, em especial o metanol. Em um experimento preliminar, a imersão em metanol promoveu a desintegração das membranas de fibra de vidro e nitrato de celulose, obtendo-se efeito tóxico também nos brancos (problema também registrado por BRILIS et al, 2005). Como alternativa, neste estudo optou-se pela recuperação dos sólidos retidos nas membranas por meio da lavagem destas com o próprio filtrado (USEPA, 1991b). A toxicidade exibida por esta solução deve ser similar à do teste base.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos ensaios ecotoxicológicos são apresentados na Figura 1. Observando-se os valores de CI25 obtidos nos testes-base, é possível constatar que a toxicidade das águas coletadas no ponto CFUG 02900 é consistente, mantendo, inclusive, sua intensidade ao longo do tempo.



COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL

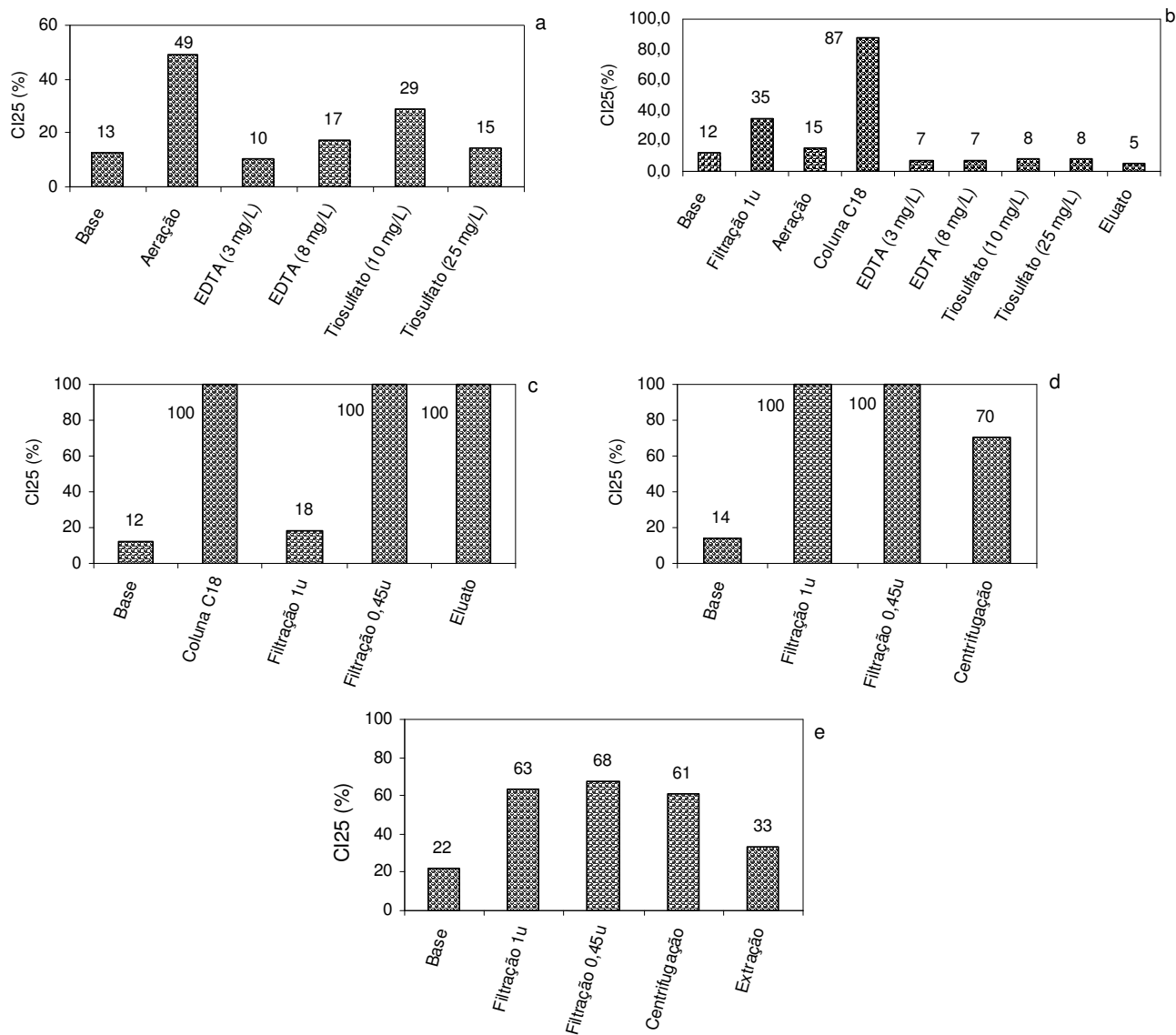


Figura 1: Resultados obtidos nos ensaios ecotoxicológicos efetuados com as amostras sem manipulação (base) e após as diferentes manipulações: (a) Maio/2006; (b) Agosto/2006; Outubro/2006; (d) Dezembro/2006 e (e) Fevereiro/2007.

A aplicação dos procedimentos relativos à fase de caracterização à primeira amostra (Maio/2006), demonstrou que apenas a aeração e a adição de 10 mg/L de tiosulfato de sódio reduziram a toxicidade (Figura 1a). Entretanto, a análise estatística apontou que apenas a primeira manipulação promoveu uma redução significativa (Tabela 1). É importante ressaltar que não se dispõe dos resultados relativos à filtração e à extração em fase sólida, pois nesses tratamentos observou-se 100% de mortalidade dos organismos-



teste em todas as concentrações, inclusive nos brancos. Tal fato indica a provável lixiviação de alguma substância tóxica a partir da membrana de fibra de vidro, comprometendo ambas as manipulações.

Tabela 1: Resultados dos ensaios e significância dos efeitos produzidos pelas diferentes manipulações das amostras.

Campanha	Manipulação	CI25 (em %) e respectivo intervalo de confiança	Efeito resultante
Maio/06	Base	12,98 (10,0 – 27,5)	
	Aeração	49,05 (33,44 – 64,78)	S
	EDTA (3 mg/L)	10,22 (7,84 – 26,6)	NS
	EDTA (8 mg/L)	17,45 (10,29 – 62,5)	NS
	Na ₂ S ₂ O ₃ (10 mg/L)	28,80 (8,97 – 40,22)	NS
	Na ₂ S ₂ O ₃ (25 mg/L)	14,68 (10,95 – 58,33)	NS
Agosto/06	Base	11,86 (10,7 – 13,97)	
	Filtração (1 µm)	35,17 (17,38 – 49,87)	S
	Aeração	14,45 (11,19 – 30,56)	NS
	EDTA (3 mg/L)	7,01 (6,49 – 8,19)	NS
	EDTA (8 mg/L)	6,78 (6,46 – 7,48)	NS
	Na ₂ S ₂ O ₃ (10 mg/L)	8,17 (6,5 – 13,9)	NS
	Na ₂ S ₂ O ₃ (25 mg/L)	8,23 (7,19 – 11,08)	NS
	Coluna C ₁₈	87,48 (NC) ^(*)	S
Outubro/06	Base	12,08 (7,38 – 36,72)	
	Filtração (1 µm)	17,99 (NC)	NS
	Filtração (0,45 µm)	>100,0	S
	Coluna C ₁₈	> 100,0	S
Dezembro/06	Base	14,0 (10,23 – 41,96)	
	Centrifugação	70,31 (19,14 – 83,94)	S
	Filtração (1 µm)	> 100,0	S
	Filtração (0,45 µm)	> 100,0	S
Fevereiro/07	Base	22,9 (10,23 – 67,6)	
	Filtração (1 µm)	63,44 (23,3 – 77,09)	S
	Filtração (0,45 µm)	67,71 (NC)	S
	Centrifugação	61,33 (22,98 – 76,10)	S

(*) NC = Não calculável

(S) Significativo

(NS) Não Significativo

Na segunda campanha, obteve-se uma diminuição dos efeitos tóxicos sobre *Ceriodaphnia dubia* após a filtração em membrana de fibra de vidro e, principalmente, após a passagem através da coluna de octadecil (Figura 1b). Em ambos os casos, a redução foi significativa, conforme a conclusão da análise estatística (Tabela 1). Tais resultados,



aliados à recuperação da toxicidade no eluato com metanol, apontam compostos orgânicos não polares como agentes primários.

Dentre as análises químicas efetuadas, apenas alumínio dissolvido e manganês total foram detectados em concentrações superiores aos respectivos limites estabelecidos para a classe 2 (CONAMA 357/05); tais valores, porém, seriam insuficientes para causar efeito crônico a esse microcrustáceo, na faixa de dureza e pH normalmente registrada nas amostras coletadas nesse ponto (Tabela 2). No caso do manganês, LASIER et al (2000) obtiveram uma CI50 de 3,9 mg/L, concentração dez vezes mais elevada que a registrada na presente amostra (Tabela 2). Em relação ao alumínio, ROY et al (2000) também não observaram efeito na sobrevivência e reprodução de *C. dubia* em amostras ambientais com concentrações de alumínio dissolvido entre 0,12 e 0,39 mg/L. Além disso, embora tais metais pudessem estar adsorvidos ao material particulado da coluna d'água, quando seriam removidos pela filtração e pela coluna, não seriam recuperados pela eluição com metanol.

Tabela 2: Resultado das principais análises físicas, químicas e biológicas efetuadas com as amostras do ponto CFUG 02900

Variável	Data de coleta				
	Maio/06	Agosto/06	Outubro/06	Dezembro/06	Fevereiro/07
pH (u. pH)	7,9	7,7	7,6	7,8	7,2
Oxigênio dissolvido (mg/L)	5,3	7,6	7,7	7,5	8,1
Dureza (mg/CaCO ₃ /L)	NR	40,0	NR	NR	42,0
Condutividade (µS/cm)	143,0	167,0	151,9	142,6	153,3
Alumínio dissolvido (mg/L)	NR ⁽¹⁾	0,25	<0,1	0,12	0,13
Cádmio total (mg/L)	NR	0,0002	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Chumbo total (mg/L)	NR	0,004	0,003	<0,002	<0,002
Cobre dissolvido (mg/L)	NR	<0,01	<0,01	<0,01	-
Cobre total (mg/L)	-	-	-	-	<0,009
Ferro dissolvido (mg/L)	NR	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Manganês total (mg/L)	NR	0,34	0,04	0,11	0,08
Mercúrio total (mg/L)	NR	<0,0001	<0,0002	<0,0002	<0,0002
Níquel total (mg/L)	NR	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02
Zinco total (mg/L)	NR	0,03	<0,02	0,03	<0,02
Microcistinas (µg/L)	NR	<0,15	-	<0,15	-
Nº de células de cianobactérias/mL	NR	209730	208970	302500	477000

(1) Análise não realizada

Por outro lado, a análise do fitoplâncton indicou a presença de cianobactérias em densidade superior ao limite de 50.000 células/mL para águas de classe 2 (CONAMA 357/05). Estas algas poderiam ser responsáveis pelos efeitos tóxicos da amostra, pois diversos estudos têm demonstrado que as mesmas podem afetar negativamente



COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL

invertebrados por meio da liberação de compostos tóxicos e da interferência na captura de alimentos, devido à obstrução dos apêndices filtradores (LAMPERT, 1981; FULTON & PAERL, 1987). Assim, a filtração em membrana de 1 μm removeria as algas e a coluna reteria não só tais organismos, mas também, as toxinas possivelmente dissolvidas, as quais seriam recuperadas pelo metanol (este procedimento corresponde exatamente a parte de uma das metodologias utilizadas para extração e análise de toxinas produzidas por cianobactérias).

Em função de tais suposições, na terceira campanha (Outubro/2006) foram efetuados os procedimentos da fase II referentes às manipulações que apresentaram efeito mais significativo sobre a toxicidade nos meses anteriores. Com relação à filtração, seguindo o proposto em USEPA (1993), introduziu-se um filtro de material diferente (nitrato de celulose) e de menor porosidade (0,45 μm). Inversamente ao registrado na campanha anterior, a passagem da amostra na membrana de 1 μm não promoveu redução da toxicidade (Figura 1c). Já a filtração em membrana de 0,45 μm e a extração em uma das colunas de octadecil reduziram significativamente (8,3 vezes) os efeitos tóxicos (Tabela 1).

Como não houve recuperação da toxicidade no eluato com metanol, pode-se supor que não havia toxinas dissolvidas e que os efeitos tóxicos seriam decorrentes do próprio material particulado (predominantemente as cianofíceas), com dimensões entre 0,45 μm e 1 μm , que teria aderido aos filtros.

Com a quarta amostra (Dezembro/2006), foram repetidas as técnicas voltadas à identificação da toxicidade por materiais filtráveis, inserindo, ainda, a centrifugação (USEPA, 1993). Os resultados obtidos (Figura 1d), confirmam tais agentes como prováveis responsáveis pelo efeito crônico a *Ceriodaphnia dubia*. Assim, a análise estatística indicou que a toxicidade foi significativamente reduzida no sobrenadante resultante da centrifugação; já na amostra obtida após a passagem através das membranas de 0,45 μm e 1 μm , a análise estatística não foi efetuada devido à impossibilidade de cálculo do intervalo de confiança. Entretanto, tais manipulações foram consideradas efetivas, pois as respectivas razões entre a CI25 do teste com a alíquota da amostra manipulada e a CI25 do teste-base foram superiores a 2.

De modo similar, com a amostra coletada em fevereiro de 2007, tanto a filtração através das membranas de 1 e 0,45 μm , quanto a centrifugação, tornaram a amostra três vezes menos tóxica. Posteriormente, efetuou-se a lavagem da membrana de 1 μm com a própria amostra filtrada, o que permitiu a recuperação de grande parte dos sólidos retidos (predominantemente cianofíceas) e, também, da toxicidade crônica a *C. dubia*, com a obtenção de uma CI25 de 33%.

Dessa forma, apesar da falta de especificidade do processo de filtração, dificultando a identificação do(s) agente(s) tóxico(s), no presente estudo pode-se inferir que as



COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL

cianobactérias são responsáveis pelo efeito crônico observado nos ensaios ecotoxicológicos com *Ceriodaphnia dubia*. Conforme já mencionado, florações de cianofíceas podem afetar estes microcrustáceos por interferência mecânica, reduzindo a captura de alimentos (KURMAYER, 2002). No caso das amostras do CFUG 02900 a toxicidade pode resultar desta interferência física, devido às elevadas densidades das formas filamentosas *Cylindrospermopsis* e *Planktothrix*, provenientes do reservatório Billings (CETESB, 2007).

Por outro lado, as cianobactérias também podem inibir o desenvolvimento de organismos zooplanctônicos por meio da produção de substâncias tóxicas. Dependendo das condições ambientais e do seu estado fisiológico, algumas cianofíceas podem produzir toxinas que, mesmo quando não liberadas no meio, podem causar intoxicação quando ingeridas (ROHRLACK et al, 2001).

No presente estudo, um único grupo dessas substâncias – o das microcistinas – foi analisado em algumas amostras mediante a técnica de radioimunoensaio (ELISA), sem que fossem obtidos os extratos para avaliação de seus efeitos tóxicos a *Ceriodaphnia dubia*. Conseqüentemente, para a identificação efetiva do agente responsável pela toxicidade das amostras, torna-se necessária a aquisição de kits específicos para quantificação de outras toxinas possivelmente produzidas por estas cianofíceas, como cilindrospermopsinas e saxitoxinas - segundo CETESB (1998), estas últimas já foram registradas em duas cepas de *Cylindrospermopsis raciborskii* isoladas no Reservatório Billings em 1997, tendo uma delas causado toxicidade aguda a *Daphnia similis*. Além disso, deve-se efetuar a confirmação do agente suspeito mediante a concentração das toxinas que forem detectadas, seguida da realização dos ensaios ecotoxicológicos.

4- CONCLUSÃO

A aplicação dos procedimentos para avaliação e identificação da toxicidade, permitiu concluir que o efeito tóxico crônico observado nos ensaios com amostras de águas superficiais do Canal de Fuga II, é decorrente do material em suspensão, constituído predominantemente por cianobactérias. Estas, seja pela eventual produção de toxinas ou por processos mecânicos, são responsáveis pela inibição da reprodução de *Ceriodaphnia dubia*.

5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT. 2005. Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade crônica – Método de ensaio com *Ceriodaphnia* spp. (Crustacea, Cladocera). Norma ABNT-NBR 13373, Rio de Janeiro, 15p.



COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL

BRASIL. CONAMA. Resolução nº 357, de 17 de Março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos d'água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes e dá outras providências. Diário Oficial da União. República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasil, DF. 18 mar. 2005. Seção 1.

BRILIS, J.; FOEKEMA, E.; SNEEKES, A.; ZWIERS, M.; BROKKE, J. and BERBE, R. (2005). Toxicity identification evaluation: unexpected toxic compounds in effluent from a metal processing factory in the Netherlands. In: Toxicity reduction and Toxicity Identification Evaluations for Effluents, Ambient Waters and Other Aqueous Media. T. J. Norberg-King, L. W. Ausley; D. T. Burton; W.L. Goodfellow; J. L. Muller and W. T. Waller eds. Setac Press. pp. 274-287.

CETESB. (1998). Toxicidade da alga *Cylindrospermopsis raciborskii* isolada do reservatório Billings, braço do Taquacetuba. Relatório Técnico. 23p + anexos.

CETESB. (2005). Relatório de Qualidade das Águas Interiores do Estado de São Paulo - 2004. V.1. 297p.

CETESB. (2006). Relatório de Qualidade das Águas Interiores do Estado de São Paulo - 2005. V.1. 488p.

CETESB. (2007). Relatório de Qualidade das Águas Interiores do Estado de São Paulo - 2006. V.1. 327p.

CHAPMAN, P. M. (2000). Whole effluent toxicity testing – usefulness, level of protection and risk assessment. Environmental Toxicology and Chemistry. V.19(1). P.3-13.

FULTON III R. S. & PAERL, H. W. (1987). Toxic effects of the blue-green alga *Mycrocystis aeruginosa* on herbivorous zooplankton. Journal of Plankton Research. V. 9(5): 837-855.

KURMAYER, R. (2001). Competitive ability of *Daphnia* under dominance of non-toxic filamentous cyanobacteria. Hydrobiology. v. 442: 271-289.

LAMPERT, W. (1981). Inhibitory and toxic effects of blue-green algae on *Daphnia*. Int. Revue ges Hydrobiol. 66(3): 285-298.

LASIER, P. J.; WINGER, P.V. and BOGENRIEDER, K. J. (2000). Toxicity of manganese to *Ceriodaphnia dubia* and *Hyalella azteca*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology. V. 38(3): 298-304.

NORBERG-KING, T. J. (1993). A linear interpolation method for sublethal toxicity: the inhibition concentration (ICp) approach. Version 2.0 (software). USEPA – Duluth (MN).



COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL

ROHRLACK, T.; BOERNER, T.; DITTMANN, E.; KAEBERNICK, M. and CHRISTOFFERSEN, K. (2001). The effects of food-associated microcystins on *Daphnia* and other potential grazers of cyanobacteria. Fifth International Conference on Toxic Cyanobacteria. Noosa-Queensland – Abstracts.

ROY, R.L.; CAMPBELL, P. G. C.; PRÉMONT, S. and LABRIE, J. Geochemistry and toxicity of aluminum in the Saguenay River, Québec, Canada, in relation to discharges from an aluminum smelter. *Environmental Toxicology and Chemistry*. V. 19(10): 2457-2466.

USEPA (1985). *Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents to Freshwater and Marine Organisms*. EPA/600/4-85-013. 3rd Ed.

USEPA (1991a). *Methods for Aquatic Toxicity Identification Evaluation: Characterization of Chronically Toxic Effluents, Phase I*. EPA 600/6-91/005. Environmental Research Laboratory, Duluth, MN.

USEPA. (1991b). *Methods for Aquatic Toxicity Identification Evaluations: Phase I Toxicity Characterization Procedures, Second Edition*. EPA/600/6-91/003. Environmental Research Laboratory, Duluth, MN.

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

ZAGATTO, P. A. (1998). Toxicidade da alga *Cylindrospermopsis raciborskii* isolada do Reservatório Billings, braço Taquacetuba. Relatório Técnico. CETESB. São Paulo. 23p + anexos.

**CETESB****COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL**

Equipe Técnica

Márcia Aparecida Aragão - EAHE

Sandra Valéria Buratini - EAHE