UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

RAFAEL GROSSI BOTELHO

Avaliação da qualidade da água do rio Piracicaba (SP) e efeito da vinhaça para organismos aquáticos antes e após a correção do pH

Piracicaba
2013

RAFAEL GROSSI BOTELHO

Avaliação da qualidade da água do rio Piracicaba (SP) e efeito da vinhaça para organismos aquáticos antes e após a correção do pH

Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente

Orientador: Prof. Valdemar Luiz Tornisielo

Piracicaba
2013

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Botelho, Rafael Grossi

Avaliação da qualidade da água do rio Piracicaba (SP) e efeito da vinhaça para organismos aquáticos antes e após a correção do pH / Rafael Grossi Botelho; orientador Valdemar Luiz Tornisielo. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2013.

107 p.: il.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Ecotoxicologia 2. Mutagênese 3. Poluição da água 4. Qualidade da água 5. Toxicologia ambiental 6. Vinhaça I. Título

AGRADECIMENTOS

A Deus por sempre estar presente na minha vida, me dando alegrias, saúde e sucesso.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) e ao Laboratório de Ecotoxicologia onde este trabalho foi realizado.

Ao Prof. Doutor Valdemar Luiz Tornisielo primeiramente por ter aceitado orientar-me, pela paciência, conselhos, e além de tudo pela amizade ao longo destes anos.

Á Fapesp pelo suporte financeiro para que este trabalho e outros fossem realizados.

Á minha esposa Nayara Duarte Soares e ao meu querido e precioso filho Danilo Soares Grossi Botelho por fazerem parte da minha vida.

Aos meus pais Gessy Botelho da Silva e Mara Angélica Grossi Botelho por tudo que já fizeram e ainda fazem por mim. Pelo incentivo, amizade, conselhos, apoio, educação. Sem vocês a vida não teria sentido.

Ao meu irmão Felipe Grossi Botelho, pela amizade, apoio e incentivo.

Aos amigos do Laboratório de Ecotoxicologia Sérgio Henrique Monteiro, Lucineide Aparecida Maranho, Graziela Cristina Rossi Moura Andrade, Franz Zirena Vilca, Aderbal Almeida Rocha, Nádia Hortense Torres, Eloana Janice Bonfleur, Luís Machado Neto, Paulo Alexandre de Toledo Alves, Bruno Abdon Inácio de Sousa, Jeane Francisco, Ana Carolina Ribeiro Dias, Marcela Lembi Viti, Leila Aparecida Figueiredo, Thaís Fornasiero Campion, Aline Trentini da Silveira, Ana Caroline Poppi.

Aos técnicos do Laboratório de Ecotoxicologia Carlos Alberto Dorelli e Rodrigo Floriano Pimpinato pela ajuda nas atividades laboratoriais e pela amizade.

Aos motoristas do CENA pelo transporte até o Rio Piracicaba e pela ajuda nas coletas.

Ás bibliotecárias Marília Ribeiro Garcia Henyei e Adriana Bueno Moretti da Seção Técnica de Biblioteca do Centro de Energia Nuclear na Agricultura pela formatação desta tese.

Aos professores Paulo César Melleti (UEL-Londrina), Marisa Narciso Fernandes (UFSCAR-São Carlos), Carmen Silva Fontaneti Christofoletti (UNESP-Rio Claro) pelos treinamentos realizados, dúvidas tiradas e por terem aberto às portas dos seus laboratórios.

À Dra. Cintya Aparecida Christofoletti pela colaboração nas análises de micronúcleo e alterações nucleares eritrocitárias.

À técnica do Laboratório de Histopatologia Vegetal do Centro de Energia Nuclear na Agricultura Mônica Lanzoni Rossi pela colaboração nas análises de brânquias.

À Prof.ª Adriana Pinheiro Martinelli e Neuza de Lima Nogueira por terem disponibilizados seus laboratórios e equipamentos.

Aos professores Francisco André Ossamu Tanaka e Elliot Watanabe Kitajima responsáveis pelo Laboratório de Microscopia da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz.

Aos meus primos João André e Consola por revisarem a língua portuguesa.

“O rio de Piracicaba
Vai jogar água pra fora
Quando chegar a água
Dos olhos de alguém que chora”.

Tião Carreiro, Piraci e Lourival dos Santos

RESUMO

BOTELHO, R. G. **Avaliação da qualidade da água do rio Piracicaba (SP) e efeito da vinhaça para organismos aquáticos antes e após a correção do pH**. 2013. 107 f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

A avaliação da qualidade da água do rio Piracicaba foi realizada utilizando diferentes metodologias e organismos teste, e para tanto, de fevereiro de 2011 a janeiro de 2012 amostras de água foram coletadas em seis locais de amostragens ao longo do rio Piracicaba. Parâmetros físicos e químicos da água foram mensurados e de acordo com a condutividade elétrica e demanda bioquímica de oxigênio, baixa qualidade foi observada em locais próximos a Americana e Piracicaba. Efeitos sobre a reprodução de *Ceriodaphnia dubia* e *Ceriodaphnia silvestrii* foram observados em fevereiro e março de 2011 e janeiro de 2012, e ocorreram em amostras coletadas próximas às cidades de Americana e Piracicaba. A avaliação das brânquias do peixe *Danio rerio* mostrou que para todos os meses, exceto fevereiro, setembro e outubro para alguns pontos, as alterações não foram significativas. Amostras de água coletada em todos os locais, assim como em todos os meses apresentaram valores de clorofila *a* abaixo do estabelecido pela legislação ambiental brasileira. A água coletada nos meses de outubro e novembro e aquelas amostradas à montante e à jusante de Piracicaba apresentaram maiores valores de índice de estado trófico comparado aos outros pontos e meses do ano, no entanto, não foram classificadas como eutrofizadas. Concentrações dos herbicidas atrazina e ametrina também foram determinadas na água do rio Piracicaba e variaram de 0,11 a 1,92 µg L^{-1} e 0,25 a 1,44 µg L^{-1}, respectivamente, e mostraram ter potencial mutagênico e genotóxico para *D. rerio*. Um estudo avaliando a toxicidade da vinhaça antes e após a correção do pH também foi realizado já que o rio Piracicaba está localizado em uma região influenciada por plantações de cana-de-açúcar. Os resultados apresentados confirmam que a vinhaça possui alta toxicidade aguda para organismos aquáticos, no entanto, esta pode ser reduzida através da correção do seu pH para 6,5.

Palavras-chave: Ametrina. Atrazina. Biomonitoramento. Brânquias. Toxicidade. Genotoxidade. Microcrustáceos. Mutagenicidade. Vinhaça.

ABSTRACT

BOTELHO, R. G. **Assessment of water quality of the Piracicaba River (São Paulo, Brazil) and effects of vinasse to aquatic organisms before and after pH correction.** 2013. 107 f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

An assessment of water quality of the Piracicaba River was performed using different methodologies and organisms, and therefore, from February 2011 to January 2012 water samples were collected at six sampling sites along the Piracicaba River. Physical chemical parameters of the water were measured and demonstred low water quality according to the conductivity and biochemical oxygen in places close to Americana and Piracicaba. Effects on the reproduction of *Ceriodaphinia dubia* and *Ceriodaphnia silvestrii* were observed in February and March 2011, and January 2012 and occurred in samples collected close to Americana and Piracicaba cities. Evaluation of the gills of *Danio rerio* showed no significant difference during all months, except in February, September and October for some locations. During the study period, water samples collected in all sampling sites and months presented values of chlorophyll *a* below the limit set by the Brazilian environmental law. Water collected in October and November and those sampled upstream and downstream of Piracicaba presented higher values of throfic state index than the other sites and months, however, were not classified as euthrofic. Concentrations of atrazine and ametrine during the sampling period were also measured and ranged from 0.11 to 1.92 µg L^{-1} and from 0.25 to 1.44 µg L^{-1}, respectively, and showed genotoxic and mutagenic potentials to *D. rerio*. A study evaluating the acute toxicity of vinasse before and after the pH correction was conducted due to the influence of sugar cane cultures on the Piracicaba River area. The results confirmed the high acute toxicity of vinasse to aquatic organisms, however, this can be reduced by correcting its pH to 6.5.

Key-words: Atrazine. Ametrine. Biomonitoring. Gills. Toxicity. Genotoxicity. Microcrustaceans. Mutagenicity. Vinasse.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 13
2. REVISÃO DE LITERATURA 14
2.1 Avaliação da qualidade dos ambientes aquáticos: uma abordagem ecotoxicológica 14
2.2 Ensaio mutagênico e genotóxico na avaliação de ambientes aquáticos 15
2.3 Brânquias como biomarcador de contaminação ambiental 16
2.4 A cromatografia na determinação de poluentes nos ambientes aquáticos 16
2.5 Propriedades da vinhaça e sua aplicação na agricultura 17
REFERÊNCIAS 19
3. Avaliação da qualidade da água usando abordagens ecotoxicológicas: o estudo de caso do rio Piracicaba (São Paulo, Brasil) 24
3.1 Introdução 25
3.2 Materiais e Métodos 27
3.2.1 Precipitação na Bacia do rio Piracicaba 27
3.2.2 Amostragem e parâmetros físicos e químicos 27
3.2.3 Manutenção e delineamento experimental com *C. dubia* e *C. silvestrii* 28
3.2.4 Manutenção e delineamento experimental com *D. rerio* 29
3.2.5 Análise estatística 30
3.3 Resultados e Discussão 30
3.3.1 Precipitação na Bacia do rio Piracicaba 30
3.3.2 Parâmetros físicos e químicos 31
3.3.3 Teste de toxicidade crônica com *C. dubia* e *C. silvestrii* 33
3.3.4 Mortalidade e avaliação histopatológica das brânquias 36
3.4 Conclusão 43
Referências 43
4. Avaliação espaço-temporal da clorofila *a* no rio Piracicaba (São Paulo, Brasil) e determinação do índice de estado trófico 48
4.1 Introdução 49
4.2 Materiais e Métodos 50
4.2.1 Precipitação na Bacia do rio Piracicaba 50
4.2.2 Caracterização da área de estudo 50
4.2.3 Período e locais de amostragem 51
4.2.4 Determinação de clorofila *a* e IET 51

4.3. Resultados e Discussão.....53
4.4 Conclusão.....59
Referências.....60
5. Concentrações de atrazina e ametrina encontradas no rio Piracicaba (São Paulo, Brasil) induzem a formação de micronúcleo e alterações nucleares eritrocitária em peixes.....63
5.1 Introdução.....64
5.2 Materiais e Métodos.....66
5.2.1 Localização e período de amostragem.....66
5.2.2 Solventes e reagentes químicos.....67
5.2.3 Preparo da amostra e condições cromatográficas.....67
5.2.4 Otimização do espectrômetro de massa.....68
5.2.5 Validação do método cromatográfico.....68
5.2.6 Teste do micronúcleo e alterações nucleares eritrocitárias.....69
5.3 Resultados e Discussão.....70
5.3.1 Validação do método cromatográfico e determinação dos herbicidas atrazina e ametrina na água do rio Piracicaba.....70
5.3.2 Micronúcleo e alterações nucleares em eritrócitos de peixes.....75
5.4 Conclusão.....82
Referências.....83
6. Toxicidade aguda da vinhaça de cana-de-açúcar para organismos aquáticos antes e após a correção do pH.....90
6.1 Introdução.....91
6.2 Materiais e Métodos.....92
6.2.1 Correção do pH.....92
6.2.2 Manutenção e delineamento experimental com *C. dubia*.....92
6.2.3 Manutenção e delineamento experimental com *D. magna*.....93
6.2.4 Manutenção e delineamento experimental com *D. rerio*.....93
6.2.5 Análise estatística.....94
6.3 Resultados e Discussão.....94
6.4 Conclusão.....103
Referências.....104
7. Conclusões Gerais.....107

1. **INTRODUÇÃO**

Os rios são um dos mais importantes recursos de água doce do mundo com benefícios tanto para a população (abastecimento urbano, irrigação, navegação, pesca, aqüicultura, etc) como para as diversas formas de vida que neles habitam. No entanto, com o passar dos anos a condução de trabalhos científicos relacionados à determinação de sua qualidade vem aumentando proporcionalmente com o aumento de sua poluição.

A preservação da qualidade das águas de um rio requer efetivo monitoramento. Há muitos anos atrás, a avaliação da qualidade dos ambientes aquáticos era realizada apenas pela determinação de parâmetros físico-químicos, no entanto, a partir da década de 60 quando foi criado o termo Ecotoxicologia, observou-se que aliado a estes parâmetros a utilização de organismos vivos proporcionava resultados mais confiáveis.

O rio Piracicaba é dentre os rios da bacia do Estado de São Paulo que merecem destaque quando o assunto é poluição dos ambientes aquáticos já que está localizado em áreas altamente influenciadas pelo setor industrial onde se destaca as indústrias têxteis, petroquímicas, metalúrgicas, sucroalcooleiras, dentre outras. Além disso, a cultura de cana-de-açúcar é a principal monocultura presente nas áreas onde o rio Piracicaba está inserido, e desta forma, a contaminação tanto por herbicidas que são aplicados nesta cultura tais como atrazina e ametrina, como também pela vinhaça que tem sido amplamente utilizada na fertirrigação pode ocorrer.

Desta forma, visando conhecer a real situação das águas do rio Piracicaba, um estudo a longo prazo foi realizado utilizando várias ferramentas e assim este trabalho foi dividido em quatro capítulos. No primeiro capítulo foi avaliado a qualidade da água deste ambiente aquático através da determinação de parâmetros físico-químicos e ensaios ecotoxicológicos com os microcrustáceos *Ceriodaphnia dubia* e *Ceriodaphnia silvestrii*, além do peixe *Danio rerio*. A determinação do índice de estado trófico baseado na concentração de clorofila *a* foi realizada e os resultados estão apresentados no seundo capítulo. Devido à influência das culturas de cana-de-açúcar na região do rio Piracicaba, dois dos principais herbicidas que são aplicados nesta cultura (atrazina e ametrina) foram determinados na água para posteriormente avaliar o seu potencial genotóxico e mutagênico para *Danio rerio*. Finalmente, foi realizado ensaios agudo com o objetivo de avaliar a influência do pH na sua toxicidade para organismos aquáticos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Avaliação da qualidade dos ambientes aquáticos: uma abordagem ecotoxicológica

A avaliação da qualidade dos recursos hídricos se tornou mais eficiente de ser realizada após a criação do termo ecotoxicologia por Rene Truhaut em 1971. Os primeiros ensaios ecotoxicológicos com organismos vivos geravam desconfiança, no entanto, à medida que as pesquisas avançaram ficou claro que estes eram capazes de responder às condições adversas do ambiente ou até mesmo aos efeitos de agentes químicos. A partir daí, várias normas de padronização para testes de toxicidade começaram a ser elaborada cada uma para diferentes organismos, tais como para algas (ABNT, 1992; CETESB, 1993; OECD, 2006), microcrustáceos (CETESB, 1994; OECD, 1998; 2004; ABNT, 2003), peixes (OECD, 1984; 1992; 2012; CETESB, 1990; ABNT, 2004), dentre outras.

Basicamente, os ensaios de toxicidade podem ser divididos em agudo e crônico. O teste agudo mede os efeitos adversos de contaminantes ou amostras ambientais durante um curto período de tempo que varia geralmente de 0 a 96 horas sendo possível determinar, por exemplo, para peixes e microcrustáceos a concentração letal média para 50% (CL_{50}) dos indivíduos expostos. Para microcrustáceos, pode ainda ser avaliado o efeito agudo através da concentração efetiva média para 50% dos indivíduos (CE_{50}), sendo que neste caso, a imobilidade é o parâmetro mensurado (RAND; PETROCELLI, 1985). Nos ensaios de toxicidade crônica, os organismos são expostos a uma substância por um período de tempo significativo do ciclo de vida que pode variar da metade a dois terços do ciclo (RAND; PETROCELLI, 1985), e os parâmetros avaliados são diversos, tais como, reprodução, crescimento, comportamento, alterações fisiológicas, bioquímicas e histológicas. Neste teste, as concentrações avaliadas devem ser baixas para não causar a mortalidade e dependem diretamente da CL_{50}/CE_{50} determinada no ensaio agudo.

Atualmente, várias ferramentas ecotoxicológicas vêm sendo utilizadas para avaliar o potencial tóxico de substâncias para um determinado organismo, assim como para determinar a qualidade da água de um ecossistema aquático, e, dentre elas merecem destaques os ensaios mutagênicos, genotóxicos e alterações histopatológicas das brânquias. Além disso, no monitoramento dos recursos hídricos, determinar a presença de agentes químicos nestes é de extrema importância para saber sua concentração, alertar o produtor sobre o uso excessivo, e

ainda traçar planos estratégicos para diminuição da possibilidade deste evento acontecer. Neste caso, a utilização de técnicas cromatográficas tem sido bastante eficiente.

Outra questão importante a ser mencionada é a utilização de resíduos industriais em solos agrícolas como fertirrigação a fim de melhorar a qualidade das culturas. Neste caso, a vinhaça de cana-de-açúcar merece destaque pela sua ampla utilização, principalmente nas áreas de cultura de cana-de-açúcar. Sendo assim, é importante conhecer se este resíduo ao se deslocar para ambientes aquáticos promoverá efeitos negativos na biota e caso a toxicidade seja confirmada encontrar ferramentas que a eliminem ou a reduzam.

2.2 Ensaio mutagênico e genotóxico na avaliação de ambientes aquáticos

Trabalhos abordando efeitos mutagênicos e genotóxicos utilizando organismos aquáticos têm sido realizados desde há muitos anos (CARRASCO; TILBURY, MAYERS, 1990; AL-SABTI; METCALFE, 1995; AYLLÓN; GARCIA-VAZQUEZ, 2000; BARSIENE; SYVOKIENE, BJORNSTAD, 2006; BINELLI et al., 2009; CAVAS, 2011). Neste sentido, duas ferramentas têm sido utilizadas para avaliar a mutagenicidade e genotoxidade de substâncias ou amostra ambiental: o teste do micronúcleo (MN) e alterações nucleares eritrocitárias (ANE).

MN são pequenas massas citoplasmáticas que aparecem fora do núcleo principal podendo surgir a partir de quebras ou rupturas dos cromossomos durante a divisão celular (WINTER; ELLIS, HUTCHINSON, 2007). A aplicação deste teste na avaliação da mutagenicidade de agentes químicos e amostras ambientais tem sido realizada principalmente em peixes, embora o ensaio fosse inicialmente desenvolvido para mamíferos (HEDDLE et al., 1983). O teste do MN ganhou o seu espaço, pois comparado a outros ensaios, apresenta algumas vantagens incluindo baixo custo, rapidez nas análises para um grande número de substâncias, além de ser eficiente e preciso.

Durante a análise de MN, alguns autores têm observado a ocorrência de outras anormalidades sugerindo desta forma que estas podem ser levadas em consideração durante a análise de MN (TOLBERT; SHY, ALLEN, 1992; FENECH et al., 1999). Tais anormalidades têm sido relatadas após exposição de peixes a agentes químicos e águas poluídas (CAVAS; ERGENE-GOZUKARA, 2003) e têm sido classificadas por alguns autores como indício de genotoxicidade. Além disso, As formações das ANE foram descritas por Carrasco, Tilbury e Mayers (1990) como *blebbed*, núcleo que apresenta uma pequena envaginação, *notched*, núcleo que apresenta um formato de rim e *lobed* núcleo que apresenta uma envaginação maior

que a do núcleo *blebbed*. Apesar de haver uma vasta literatura a respeito do assunto, os mecanismos responsáveis pela formação dessas anormalidades ainda não foram bem descritos (PACHECO; SANTOS, 1996; AYLLÓN; GARCÍA-VAZQUEZ, 2001).

2.3 Brânquias como biomarcador de contaminação ambiental

Pelo fato das brânquias serem responsáveis pela respiração e regulação iônica nos peixes, pesquisas têm focado sobre os efeitos causados sobre esse órgão (DE LA TORRE; FERRARI; SALIBIÁN, 2005; NIGRO et al., 2006). As brânquias na maioria dos teleósteos são formadas por quatro arcos, nos quais estão inseridas duas fileiras de filamentos branquiais ou lamela primária. Na região interbranquial se encontram os vasos sanguíneos, músculos e terminações nervosas. Já na superfície dos filamentos branquiais existem dobras que dão origem às lamelas secundárias, onde ocorrem as trocas gasosas (HUGHES, 1984). Essas estruturas são compostas por três tipos de células: as pavimentosas ou respiratórias, as células cloreto (responsáveis pela troca iônica) e as células mucosas, que desempenham função de proteção (NEWMAN; JAGOE, 1994). O epitélio não respiratório é formado por várias camadas de células, enquanto que o respiratório (lamelas secundárias) é formado por duas camadas de células pavimentosas (PERRY; LAURENT, 1993). De acordo com Oliveira-Ribeiro et al. (2005), as brânquias têm sido uma ferramenta eficiente no biomonitoramento devido à sua ampla área superficial em contato com a água e alta permeabilidade, motivo pelo qual impactos nos ambientes aquáticos causados tanto por agentes químicos como por amostras ambientais podem alterar a sua estrutura (SCHWAIGER et al., 1997; TEH; ADAMS; HINTON, 1997). Diversos estudos têm sido conduzidos utilizando este órgão na avaliação da toxicidade (SALAZAR-LUGO et al., 2011; PAULINO; SOUZA; FERNANDES, 2012; SHIOGIRI et al., 2012; BOTELHO et al., 2012).

2.4 A cromatografia na determinação de poluentes nos ambientes aquáticos

A determinação da presença de poluentes nos ambientes aquáticos tem sido uma importante ferramenta na avaliação da qualidade da água a fim de determinar a concentração da molécula e ainda alertar as agências de proteção ambiental quanto à utilização indiscriminada e frequente de produtos. Neste caso, uma das técnicas utilizadas tem sido a cromatografia. As análises cromatográficas têm como objetivo separar, identificar, e quantificar substâncias, e neste caso destaca-se a cromatografia líquida e a cromatografia

gasosa, que se diferem uma da outra basicamente pelo fato de que na líquida a fase móvel é um líquido (solvente) e na gasosa é um gás (COLLINS; BRAGA, 1987).

Uma precisa e correta identificação e quantificação de classes diferentes de produtos em baixas concentrações é um desafio. A tendência para o uso de moléculas mais polares, principalmente se tratando de agrotóxicos, impulsionou a aplicação da cromatografia líquida, especialmente quando acoplada à espectrometria de massas. Neste caso, estas duas ferramentas juntas representam uma importante ferramenta para a determinação desta classe de produtos, uma vez que a maioria deles é polar, possuem baixa volatilidade, o que os tornam impróprios para serem analisados por cromatografia gasosa. A cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massa (LC-MS/MS) apresenta ainda alta sensibilidade e seletividade para inúmeros compostos, o que a torna uma importante técnica para esta finalidade (KUSTER; ALDA; BARCELÓ, 2006).

2.5. Propriedades da vinhaça e sua aplicação na agricultura

A indústria sucroalcooleira representa uma importante fonte de economia para o desenvolvimento do Brasil (AGUIAR et al., 2010). No entanto, como a maioria das atividades industriais, este setor também produz resíduos que se não tratados adequadamente podem causar problemas aos ambientes terrestres e aquáticos, sendo este último, o principal receptor de substâncias tóxicas de origem industrial (FERREIRA et al., 2011).

Vinhaça é um efluente gerado a partir da destilação do álcool. Estima-se que para cada litro de álcool obtido seja produzido de 8 a 18 litros de vinhaça (PARNAUDEAU et al., 2008) com a composição variando de acordo com os materiais e equipamentos utilizados no processo de destilação (KUMAR et al., 1998; NAIK; JAGADEESH; ALAGAWADI, 2008). Este resíduo possui baixo pH, alta quantidade de matéria orgânica e uma coloração castanho escura (BELTRAN; DOMINGUEZ; PARTIDO, 2005; JIMÉNEZ et al., 2006; PANT; ADHOLEYA, 2007).

Devido à sua rica composição em nutrientes tais como nitrogênio, fósforo e potássio, a vinhaça tem sido utilizada como fertilizante no setor agrícola, principalmente nas culturas de cana-de-açúcar. Por outro lado, sua disposição direta no ambiente pode alterar as propriedades do solo, da água subterrânea e superficial devido ao alto teor de matéria orgânica e sólidos dissolvidos, além de produzir efeitos negativos aos microorganismos e plantas locais por ter potencial antibacteriano e fitotóxico. Ainda, pelo fato de ter coloração escura, a vinhaça pode impedir ou diminuir a penetração da luz nos rios e lagos reduzindo a atividade fotossintética

(PRASSAD; KUMAR; SRIVASTAVA, 2008). Nesse contexto, todas as características da vinhaça descritas anteriormente, a coloca como problemática aos recursos hídricos caso este resíduo chegue a estes ambientes.

REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Água – Ensaio de toxicidade com *Chlorella vulgaris* (Chlorophyceae).** Rio de Janeiro: ABNT, 1992. 8 p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade Crônica – Método de ensaio com *Ceriodaphnia* spp. (Cladócera, Crustácea).** Rio de Janeiro: ABNT, 2003.12 p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade Aguda – Método de ensaio com peixe**. Rio de Janeiro: ABNT, 2004. 19 p.

AGUIAR, M.M.; FERREIRA, L.F.R.; MONTEIRO, R.T.R. Use of vinasse and sugarcane bagasse for the production of enzymes by lignocellulolytic fungi. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 53, n.5, p. 1245-1254, 2010.

AL-SABTI, K.; METCALFE, C.D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 343, n.2-3, p. 121–135, 1995.

AYLLÓN, F.; GARCIA-VASQUEZ, E. Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in european minnow *Phoxinus phoxinus* and mollie *Poecilia latipinna*: an assessment of the fish micronucleus test. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 467, n.2, p. 177-186, 2000.

AYLLÓN, F.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Micronuclei and other nuclear lesions as genotoxicity indicators in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 49, n.3, p. 221–225, 2001.

BARSIENE, J., SYVOKIENE, J.; BJORNSTAD, A. Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in mussels exposed to bisphenol A, diallyl phthalate and tetrabromodiphenyl ether-47. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v.78, n.1, p. S105–S108, 2006.

BELTRAN, J.; DOMINGUEZ, J.; PARTIDO, E. Physico-chemical treatment for the depuration of wine distillery wastewaters (vinasse). **Water Science and Technology**, Oxford, v. 51, n.1, p. 159–66, 2005.

BINELLI, A.; COGNI, D.; PAROLINI, M.; PROVINI, A. Multibiomarker approach to investigate the state of contamination of the R. Lambro/R. Po confluence (Italy) by zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). **Chemosphere**, Oxford, v. 79, n.5, p. 518–528, 2010.

BOTELHO, R.G.; SANTOS, J.B.; FERNANDES, K.M.; NEVES, C.A. Effects of atrazine and picloram on grass carp: acute toxicity and histological assessment. **Toxicological and Environmental Chemistry**, New York, v. 94, n.2, p. 121-127, 2012.

CARRASCO, K.R.; TILBURY, K.L.; MAYERS, M.S. Assessment of the piscine micronuclei test as in situ biological indicator of chemical contaminants effects. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science**, Ottawa, v. 47, n.11, p. 2123–2136, 1997.

CAVAS, T.; ERGENE-GOZUKARA, S. Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) as cyto-genotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 538, n.1-2, p. 81–91, 2003.

CAVAS, T. In vivo genotoxicity evaluation of atrazine and atrazine-based herbicide on fish *Carassius auratus* using the micronucleus test and the comet assay. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 49, n. 6, p. 1431–1435, 2011.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Água:** teste de toxicidade aguda com peixe. II. Sistema semi-estático. São Paulo: CETESB, 1990. 29 p.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Água:** teste para avaliação de toxicidade aguda de cianofíceas (algas azuis); método de ensaio. São Paulo: CETESB, 1993. 12 p.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL**. Água:** teste de toxicidade aguda com *Daphnia similis Claus* 1876 (Cladócera, Crustácea). São Paulo: CETESB, 1994. 25 p.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L. **Introdução a métodos cromatográficos**. Campinas: Editora Unicamp, 1987. 297 p.

DE LA TORRE, F.R.; FERRARI, L.; SALIBIÁN, A. Biomarkers of a native fish species (*Cnesterodon decemmaculatus*) application to the water toxicity assessment of a peri-urban polluted river of Argentina. **Chemosphere**, Oxford, v. 59, n.4, p. 577–583, 2005.

FENECH, M.; CROTT, J.; TURNER, J.; BROWN, S. Necrosis, apoptosis, cytostasis and DNA damage in human lymphocytes measured simultaneously within the cytokinesis-block micronucleus assay: description of the method and results for hydrogen peroxide. **Mutagenesis,** Oxford, v. 14, n.6, p. 605–612, 1999.

FERREIRA, L.F.R.; M.M. AGUIAR, T.G.; MESSIAS, G.B.; POMPEU, A.M.Q.; LOPEZ, D.P. S.; MONTEIRO, R.T. Evaluation of sugar-cane vinasse treated with *Pleurotus sajor-caju* utilizing aquatic organisms as toxicological indicators. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 74, n.1, p. 132–7, 2011.

HEDDLE, J.A.; HITE, M.; KIRKHART, B.; MAVOUMIN, K.; MAC GREGOR, J.T.; NEWELL, G. T. SALAMONE, M.F. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. environmental protection agency gene-tox program. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 123, n.1, p. 61–118, 1983.

HUGHES, G. M. **General anatomy of the gills.** In: HOAR, W.S.; RANDALL, D.J. (Eds.). Fish Physiology. Orlando: Academic Press, 1984. p.1-72.

JIMÉNEZ, A.M.; BORJA, R.; MARTÍN, A.; RAPOSOB, F. Kinetic analysis of the anaerobic digestion of untreated vinasse and vinasse previously treated with *Penicillium decumbens*. **Journal of Environmental Management**, London, v. 80, n.4, p. 303–310, 2006.

KUMAR, V.; WATI,L.; NIGAM, P.; BANAT, I.M.; YADAV, B.S.; SINGH, D.; MARCHANT, R. Decolorization and biodegradation of anaerobically digested sugarcane molasses spent wash effluent from biomethanation plants by white-rot fungi. **Process Biochemistry**, Barking, v. 33, n.1, p. 83–88, 1998.

KUSTER, M.; ALDA, M.L.; BARCELÓ, D. Analysis of pesticides in water by liquid chromatography-tandem mass spectrometric techniques. **Mass Spectrometry Review**, New York, v. 25, n.6, p. 900-916, 2006.

NAIK, N.M.; JAGADEESH, K.S.; ALAGAWADI, A.R. Microbial decolorization of spent wash: A review. **Indian Journal of Microbiology**, New Delhi, v. 48, n.1, p. 41–48, 2008.

NEWMAN, M.C.; JAGOE, C.H. **The ligandsand bioavaiability of metal in aquatics environments**. In: HAMELINK, J.L.; LANDRUN, P.F.; BERGMAN, H.L.; BENSON, W.H. **Bioavaiability, physical, chemical and biological interactions**. Boca Raton: SETAC, 1994. p.39-62.

NIGRO, M.; FALLENI, A.; DEL BARGA, I.; SCARCELLI, V.; LUCCHESI, P.; REGOLI, F.; FRENZILLI, G. Cellular biomarkers for monitoring estuarine environments: transplanted versus native mussels. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 77, n.4, p. 339–347, 2006.

OLIVEIRA RIBEIRO, C.A.; VOLLAIRE, Y.; SANCHEZ-CHARDI, A.; ROCHE, H. Bioaccumulation and the effects of organochlorine pesticides, PAH and heavy metals in the eel (*Anguilla anguilla*) at the Camargue Nature Reserve, France. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 74, n.1, p. 53–69, 2005.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Guideline 204 for testing of chemicals:** fish prolonged test; 14-day study. Paris: OECD, 1984. 9 p.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Guideline 203 for the testing of chemicals:** fish, acute toxicity test. Paris: OECD, 1992. 9 p.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Guideline 211 for testing of chemicals:** *Daphnia magna* reproduction test. Paris: OECD, 1998. 21 p.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Guideline 202 for the testing of chemicals:** Daphnia sp. acute immobilisation test. Paris: OECD, 2004. 12 p.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Guideline 201 for the testing of chemicals:** alga and cyanobacteria growth inhibition test. Paris: OECD, 2006. 25 p.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Guideline 229 for testing of chemicals**: fish short term reproduction assay. Paris: OECD, 2012. 40 p.

PACHECO, M.; SANTOS, M.A. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in the erythrocytes of *Anguilla ang uilla* L. exposed either to cyclophosphamide or to bleached kraft pulp mill effluent. **Frenesius Environmental Bulletin**, Freising, v. 5, n.11-12, p. 746–751, 1996.

PANT, D.; ADHOLEYA, A. Enhanced production of ligninolytic enzymes and decolorization of molasses distillery wastewaster by fungi under state fermentation. **Biodegradation**, Dorcdrecht, v. 18, n. 5, p. 647–59, 2007.

PARNAUDEAU, V.; CONDOM, N.; OLIVER, R.; CAZEVIEILLE, P.; RECOUS, S. Vinasse organic matter quality and mineralization potential, as influenced by raw material, fermentation and concentration processes. **Bioresource Technology**, Barking, v. 99, n.6, p. 1553–62, 2008.

PAULINO, M.G.; SOUZA, N.E.; FERNANDES, M.N. Subchronic exposure to atrazine induces biochemical and histopathological changes in the gills of a Neotropical freshwater fish, *Prochilodus lineatus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 80, n.1, p. 6-13, 2012.

PERRY, S. F.; LAURENT, P. **Environmental effects on fish gill structure and function**. In: . RANKIN, J.C.; JENSEN, F.B (Eds). Fish Ecophysiology. London: Chapman and Hall. 1993, p. 233–263.

PRASAD, K.R.; KUMAR, R.R.; SRIVASTAVA, S.N. Design of optimum response surface experiments for electro-coagulation of distillery spent wash. **Water, Air and Soil Pollution**, Dordrecht, v. 191, n.1-4, p. 5–13, 2008.

RAND, G.M.; PETROCELLI, S.R. **Fundamentals of aquatic toxicology**. Washington: Hemisphere, 1984, 665 p.

SALAZAR-LUGO, R.; MATA, C.; OLIVEROS, A.; ROJAS, L.M.; LEMUS, M.; ROJAS-VILLARROEL, E. Histopathological changes in gill, liver and kidney of neotropical fish *Colossoma macropomum* exposed to paraquat at different temperatures. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v. 31, n.3, p. 490-495, 2011.

SCHWAIGER, J.; WANKE, R.; ADAM, S.; PAWERT, M.; WOLFGANG, H.; Triebskorn, R. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. **Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery**, v. 6, n. 1, p. 75–86, 1997.

SHIOGIRI, N.S.; PAULINO, M.G.; CARRASCHI, S.P.; BARALDI, F.G.; DA CRUZ, C.; FERNANDES, M.N. Acute exposure of a glyphosate-based herbicide affects the gills and liver of the Neotropical fish, *Piaractus mesopotamicus*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v. 34, n.2, p. 388-396.

THE, S.T.; ADAMS, S.M.; HINTON, D.E. Histopathologic biomarkers in feral freshwater fish populations exposed to different types of contaminat stress. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 37, n.1, p. 51–70, 1997.

TOLBERT, P.E.; SHY, C.M.; ALLEN, J.W. Micronuclei and other nuclear abnormalities in buccal smears: methods and development. **Mutation Research**, Amsterdam, v.271, n.1, p. 69-77.

WINTER, M.J.; ELLIS, L.C.J.; HUTCHINSON, T.H. Formation of micronuclei in erythrocytes of the fathead minnow (*Pimephales promelas*) after acute treatment with mitomycin C or cyclophosphamide. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 629, n.2, p. 89–99, 2007.

3. AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DA ÁGUA USANDO ABORDAGENS ECOTOXICOLÓGICAS: O ESTUDO DE CASO DO RIO PIRACICABA (SÃO PAULO, BRASIL) [1]

Resumo

Uma avaliação da qualidade da água do rio Piracicaba (São Paulo, Brasil) utilizando diferentes metodologias e organismos foi realizada. De fevereiro de 2011 a janeiro de 2012, os microcrustáceos *Ceriodaphnia dubia* e *Ceriodaphnia silvestrii* foram expostos durante sete dias em laboratório a amostras de água coletadas mensalmente em seis locais e durante quatro dias ao peixe *Danio rerio* para avaliar efeitos na reprodução e brânquias, respectivamente. Parâmetros físicos e químicos foram mensurados e de acordo com a condutividade e demanda bioquímica de oxigênio, amostras de água coletadas próximas a Americana e Piracicaba apresentaram valores que representam baixa qualidade comparada às demais localidades. Efeitos sobre a reprodução foram observados em fevereiro e março de 2011 e janeiro de 2012, e ocorreram em amostras coletadas próximas a Americana e Piracicaba. A avaliação das brânquias não apresentou diferença significativa para todos os meses, exceto fevereiro, setembro e outubro para alguns pontos.

Palavras-chave: Brânquia. *Ceriodaphnia dúbia*. *Ceriodaphnia silvestrii*. *Danio rerio*.

Abstract

An assessement of the water quality of the Piracicaba River (São Paulo, Brazil) using different methodologies and organisms was conducted. From February 2011 to January 2012, microcrustaceans *Ceriodaphnia dubia* and *Ceriodaphnia silvestrii* were exposed during seven days under laboratory conditions to the water samples collected monthly at six locations and during four days to the *Danio rerio* to evaluate the effects on reproduction and gill, respectively. Physical chemical parameters of the water were also measured and according to the conductivity and biochemical oxygen demand, samples water collected close to Americana and Piracicaba cities demonstrated low quality compared to the others sites. Effects on the reproduction were observed in February and March 2011, and January 2012 and occurred in samples collected close to Americana and Piracicaba. Evaluation of the gills showed no significant difference during all months, except in February, September and October for some locations.

Keywords: *Ceriodaphnia dúbia*. *Ceriodaphnia silvestrii*. *Danio rerio*. Gills.

[1] Botelho, R.G.; Rossi, M.L.; Maranho, L.A.; Olinda, R.A.; Tornisielo, V.L. Evaluation of surface water quality using an ecotoxicological approach: a case study of the Piracicaba River. **Environmental Science and Pollution Research International**, Heidelberg, v.20, p.4382-4395, 2013.

3.1 Introdução

A poluição dos ambientes aquáticos tem se tornado um problema crescente nos últimos anos. Os rios são os mais importantes recursos de água doce no mundo, e desta forma estão sendo poluídos principalmente por esgotos sanitários e industriais, e ainda por produtos aplicados nos campos agrícolas (DONOHUE et al., 2006).

A preservação da qualidade de um rio requer um monitoramento efetivo, e, no entanto, a avaliação do grau de contaminação dos ambientes aquáticos era realizada principalmente por meio de análises físicas e químicas (USEPA, 1992). No entanto, tais análises, na maioria dos casos não são suficientes para informar o estado real da qualidade da água, e assim estas tem sido complementadas pelos ensaios ecotoxicológicos (FORGET et al., 2000; CAIRNS, 2002).

O Estado de São Paulo é o mais industrializado do Brasil, e problemas associados com a degradação da qualidade da água têm sido relatados para alguns rios (KRUSCHE et al., 1997; BALLESTER et al., 1999; MARTINELLI et al., 1999a; 1999b; DANIEL et al., 2002; KRUSCHE et al., 2002). Entre as áreas mais poluídas, pode ser citada a Bacia do Rio Piracicaba que possui 61 municípios, abrange uma área de 12.400 km^2, e se destaca não só pela sua atividade agrícola, mas também pelo desenvolvimento industrial e localização de grandes cidades com mais de 3.500.000 habitantes (FAVARO et al., 2004) fazendo com que ao longo do seu curso receba tanto esgotos industriais e sanitários.

A Bacia do Rio Piracicaba é formada principalmente pelos rios Piracicaba, Jaguari, Capivari e Corumbataí, e está situada em uma região subtropical (FAVARO et al., 2004). Piracicaba, o principal rio desta bacia, é formado à montante da cidade de Americana através da confluência dos rios Atibaia e Jaguari e deságua no Reservatório de Barra Bonita.

Muitos estudos têm sido conduzidos na bacia do Rio Piracicaba a fim de caracterizar sua qualidade baseada na quantificação e identificação de compostos químicos, porém, trabalhos conduzidos a longo prazo utilizando ensaios biológicos com cladóceros e peixes ainda são incipientes. Por exemplo, no estudo de Favaro et al. (2004) cuja as amostras de água foram coletadas em rios como Atibaia, Jaguari e Piracicaba, um aumento das concentrações de metais ocorreu próximo aos grandes centros urbanos e áreas industrias e agrícolas. Fostier et al. (2005) concluíram que todos os compartimentos estudados (água, sedimentos, solo e peixe) dos rios Atibainha, Cachoeira, Jaguari e Atibaia estavam contaminados com mercúrio (Hg).

Uma caracterização química inorgânica em sedimentos suspensos em alguns rios pertencentes à bacia do rio Piracicaba foi conduzido por França et al. (2010), e mais de 30 elementos químicos, incluindo alguns de grande importância ambiental como Selênio (Se), Antimônio (Sb), Cromo (Cr), Molibdênio (Mo), Zinco (Zn) e Mercúrio (Hg) foram encontrados. Neste mesmo estudo, a menor e a maior concentração dos elementos citados acima foram 0,47-3,10; 0,47-22,70; 18-646 2,98-31,9; 116-1350 e 0,04- 25,6 mg kg^{-1}, respectivamente. Finalmente, Meche et al. (2010) relataram que peixes coletados no rio Piracicaba estavam contaminados com Alumínio (Al), Estrôncio (Sr), Cromo (Cr), Arsênio (As), Zinco (Zn), Níquel (Ni), Manganês (Mn) e Chumbo (Pb). Neste estudo, 13 das 17 espécies coletadas tinham concentrações de alumínio acima de 5000 µg L^{-1} e 11 dos 14 metais determinados estavam acima do limite estabelecido pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (BRASIL, 2005).

Organismos zooplanctônicos são sensíveis à poluição e tem sido largamente utilizados em estudos ecotoxicológicos. Microcrustáceos tais como *Daphnia magna*, *Daphnia pulex* e *Ceriodaphnia dubia* têm sido recomendados por organizações internacionais (ASTM, 1992; USEPA, 1994). No entanto, os organismos padronizados pelas agências e protocolos nem sempre representam as condições específicas de uma determinada área, e desta forma, do ponto de vista ecotoxicológico é mais desejável a utilização de organismos nativos.

O presente estudo utilizou duas espécies de microcrustáceos: *C. dubia* uma espécie exótica do Brasil e *Ceriodaphnia silvestrii* uma espécie brasileira que tem sido recomendada como organismo teste em ensaios ecotoxicológicos (ABNT, 2005). Além de ampla distribuição nos corpos de água brasileiros, *C. silvestrii* possui um ciclo de vida curto, é facilmente cultivado e é tão sensível quanto *C. dubia*, um organismo internacionalmente padronizado (FONSECA; ROCHA, 2004), indicando desta forma sua adequação como organismo teste.

Embora seja de extrema importância a utilização de espécies nativas em testes ecotoxicológicos, duas características dos organismos devem ser consideradas: adaptação às condições do laboratório e disponibilidade. No presente estudo, além dos microcrustáceos foi utilizado o peixe *Danio rerio*, que além de possuir as duas características citadas anteriormente, é um organismo internacionalmente padronizado (OECD, 1992). Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a qualidade da água do rio Piracicaba durante um ano através de parâmetros físicos e químicos e ensaios ecotoxicológicos utilizando os microcrustáceos *C. dubia*, *C. silvestrii*, e o peixe *D. rerio*.

3.2 Materiais e Métodos

3.2.1 Precipitação na Bacia do rio Piracicaba

Os dados de precipitação na Bacia do rio Piracicaba durante o estudo foram fornecidos pelo Departamento de Águas e Energia Elétrica de São Paulo e foi mensurada mensalmente nas três estações de monitoramento localizadas no rio Piracicaba nas cidades de Americana, Piracicaba e Artemis.

3.2.2. Amostragem e parâmetros físicos e químicos

Amostras de água foram coletadas mensalmente ao longo do rio Piracicaba de fevereiro de 2011 a janeiro de 2012 em seis pontos de amostragens (Figura 1) (pontos 1 e 2: montante e jusante de Americana; pontos 3 e 4: montante e jusante de Piracicaba; ponto 5: Artemis; ponto 6: montante do Reservatório de Barra Bonita).

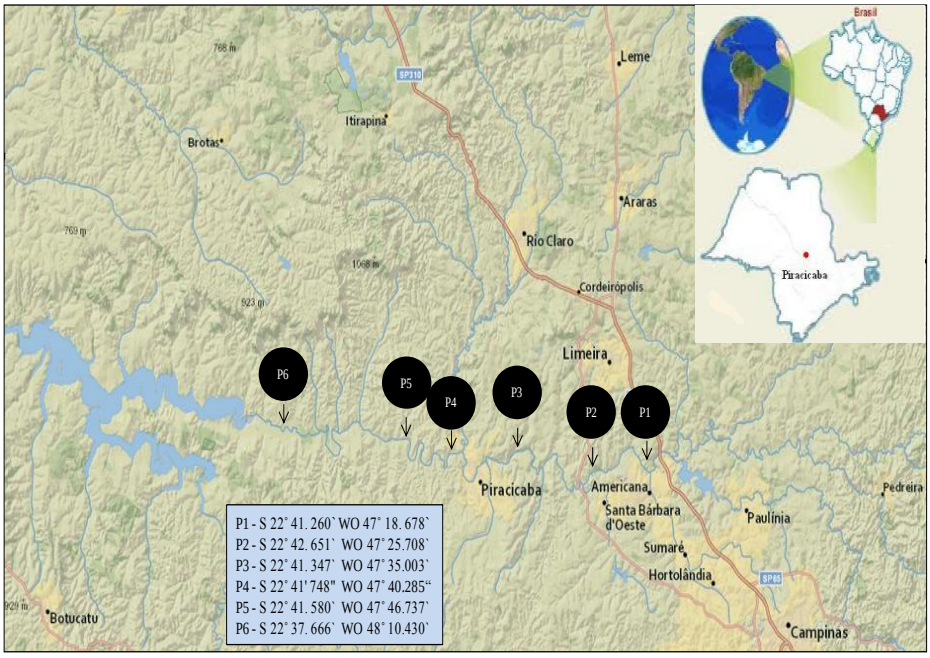

Figura 1 - Locais de amostragens de água no rio Piracicaba

Parâmetros físicos e químicos como temperatura do ar e da água e oxigênio dissolvido foram determinados no momento da amostragem. Neste caso, a temperatura do ar foi mensurada utilizando um termômetro (J Prolab 15873), e a temperatura da água e oxigênio dissolvido através de um oxímetro (YSI 55 – 12FT). Condutividade (condutivímetro Ação

Científica MCA -150 P), pH (phâmetro Ação Científica MPA – 210 P) e demanda bioquímica de oxigênio (oxímetro YSI -55) foram determinados no laboratório logo após a amostragem. Para determinar a demanda bioquímica de oxigênio, seguiu-se a metodologia da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 1992). Os resultados dos parâmetros físico e químicos foram expressos em média, desvio padrão, menor e maior valor durante o período de amostragem e coeficiente de variação. A amostragem de água foi conduzida seguindo-se o método padrão da Associação de Saúde Pública Americana (APHA, 1998).

3.2.3 Manutenção e delineamento experimental com *C. dubia* e *C. silvestrii*

Todo o procedimento para cultivo e teste de toxicidade foi realizado de acordo com a NBR 13373 da ABNT (2005). O cultivo dos microcrustáceos (água reconstituída) foi mantido em uma incubadora (40 organismos em cada cultura) no Laboratório de Ecotoxicologia Aquática do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (Piracicaba, Brasil) a uma temperatura de 25 ±2°C e com fotoperíodo de 16 horas luz e 8 horas escuro. A água reconstituída foi preparada utilizando água deionizada (Milli Q) e reagentes químicos de acordo com a NBR 13373 da ABNT (2005). Durante o estudo, a água do cultivo apresentou valores de pH e dureza de acordo com o estabelecido na norma NBR 13373 da ABNT (2005), ou seja, o pH variou de 7 a 7,6 e a dureza de 48 a 50 mg L^{-1} de $CaCO_3$. O meio de cultivo foi renovado duas vezes por semana e os organismos foram alimentados com alga *Pseudokirchneriella subcapitata* ($1x10^5$ células/organismos) três vezes por semana. Uma vez ao mês os organismos tiveram sua sensibilidade avaliada quanto à letalidade utilizando o cloreto de sódio (NaCl) como substância de referência (ABNT, 2005).

Para os testes de toxicidade, um indivíduo de *C. dubia* e *C. silvetrii* foi colocado separadamente em frascos de vidro de 30 mL contendo 20 mL da solução teste (água do rio sem diluição). Foram utilizadas 10 réplicas para cada ponto amostrado ao longo do rio Piracicaba mais o grupo controle (água do meio de cultivo). O teste foi conduzido nas mesmas condições da manutenção do cultivo. A duração do teste foi de sete dias e as soluções foram renovadas a cada dois dias com o cladócero adulto transferido para uma nova solução. Durante a renovação das soluções, os organismos foram alimentados com a alga *P. subcapitata* ($1x10^5$ células/organismos) e o número de neonatos produzidos foram anotados para posterior comparação de média entre tratamentos e controle.

3.2.4 Manutenção e delineamento experimental com *D. rerio*

Adultos de *D. rerio* foram adquiridos de um mesmo fornecedor localizado na cidade de Piracicaba, São Paulo durante todo o estudo. A cada mês, antes do início do teste os indivíduos foram aclimatados em aquários de 60 litros com água de abastecimento desclorificada. As características físico-químicas foram: oxigênio dissolvido variando de 7,0 a 7,5 mg L^{-1}, pH de 7,1 a 7,8, condutividade de 125 a 130 µS cm^{-1} e dureza de 33 a 50 mg L^{-1} de $CaCO_3$. A aclimatação dos peixes foi de cinco dias com aeração contínua da água e durante este período os organismos foram alimentados duas vezes ao dia com ração para peixe (Tetramim).

Após o período de aclimatação, os peixes foram aleatoriamente divididos em sete grupos representando os seis pontos de amostragem mais o controle com dez organismos em cada. Os peixes foram expostos à água bruta do rio Piracicaba em condições estáticas em aquário de 40 litros com aeração contínua durante 96 horas. Para o grupo controle, utilizou-se a água de manutenção. A cada 24 horas, a mortalidade foi avaliada e os organismos mortos retirados do aquário. Após o período de exposição, cinco organismos de cada tratamento foram anestesiados com gelo e tiveram o segundo arco branquial removidos. As amostras foram posteriormente fixadas em solução de Bouin, desidratadas em etanol e incorporada em hitoresina (Leica, Alemanha). Cortes de 3 µm de espessura foram corados com Azul de Toluidina e analisados utilizando imagens obtidas através de um microscópio de luz (Zeiss Axiovert 35) conectado a uma câmera (axiocam ICc3).

A frequência das alterações branquiais foi classificada em três níveis: nível 1, alterações pontualmente localizadas; nível 2, alterações espalhadas; e nível 3, alterações amplamente distribuídas no órgão de acordo com Schwaiger et al. (1997) para o cálculo do valor médio de alteração (VMA). O tipo e a severidade das alterações foram analisados seguindo-se Poleksic e Mitrovic-Tutundzic (1994) através do índice de alterações histopatológicas (IAH). Para o cálculo, utilizou-se a seguinte equação: $HAI = 10^0\sum I + 10^1\sum II + 10^2\sum III$, onde $\sum I$, $\sum II$ e $\sum III$ representam o número total de alterações em cada estágio; e 10^0, 10^1 e 10^2 são os fatores integrados de acordo com a severidade do dano. O índice obtido para cada peixe foi utilizado para o cálculo do índice médio para o grupo controle e para aqueles expostos à água dos diferentes locais de amostragem. A média do IAH foi classificada em quatro categorias: 1-10, brânquias com funcionamento normal; 11-20, alterações leves a moderadas; 21-50, alterações moderadas a severas; 51-100, alterações severas; e maiores que 100 danos irreparáveis.

3.2.5 Análise estatística

A concentração letal média (CL_{50}) 48 horas do NaCl para *C. dubia* e *C. silvestrii* foi determinada através do método Trimmed Spearman-Karber (HAMILTON; RUSSO; THURSTON, 1977). Análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Dunnet ($p<0.05$) foi utilizada para comparar os valores médios de reprodução de *C. dubia* e *C. silvestrii* entre o grupo controle e aqueles tratados com á água do rio Piracicaba, assim como os valores médios de VMA e IAH nas análises histopatológicas. Em ambas as análises (reprodução e histopatologia) foi utilizado o programa estatístico SAS versão 9.2.

3.3. Resultados e Discussão

3.3.1 Precipitação na Bacia do rio Piracicaba

A precipitação na Bacia do rio Piracicaba durante o período de amostragem foi registrada (Figura 2). Os meses que tiveram altos valores de precipitação foram: março (225 mm) e outubro (210,2 mm) de 2011 e janeiro de 2012 (207,2 mm) para Piracicaba, janeiro de 2012 (251,2 mm) para Americana e outubro de 2011 (191,4 mm) para Artemis. O período entre maio a setembro de 2011 foram os meses com menor precipitação nas três cidades: 2,0 mm em Piracicaba, 0,75 mm em Americana e 2,8 mm em Artemis, todas no mês de julho de 2011. Entre fevereiro e julho de 2011 os dados de precipitação de Americana e Artemis não foram disponibilizados pelo Departamento de Águas e Energia Elétrica de São Paulo.

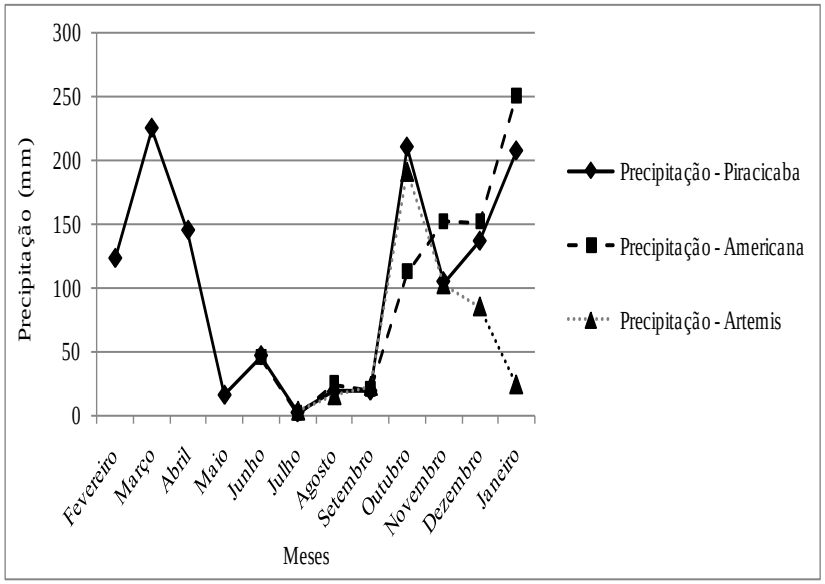

Figura 2 - Precipitação (mm) na Bacia do Piracicaba durante o período do estudo

3.3.2 Parâmetros físicos e químicos

As características físicas e químicas da água do rio Piracicaba durante o período de amostragen estão apresentadas na Tabela 1. A média da temperatura do ar e da água durante o período de estudo variou de 22,83 para 28,00 e de 22,03 para 24,57 ºC, respectivamente. A temperatura da água aumentou do ponto 1 para o ponto 6 (montante para jusante do rio) sendo que a maioria dos valores altos foram observados nos meses mais quentes (Figura 3) como fevereiro, março, abril e dezembro de 2011.

Segundo o CONAMA, para a preservação da biota aquática os rios brasileiros deveriam apresentar valores de pH entre 6 e 9 (BRASIL, 2005). No presente estudo, a média do pH durante os meses de amostragens variou entre 6,75 e 7,50 (Tabela 1), estando dentro dos valores estabelecidos na legislação.

De acordo com o CONAMA (2005), o oxigênio dissolvido deve ser maior ou igual a 6 mg L^{-1} para ambientes aquáticos de água doce (BRASIL, 2005), e somente o ponto 3 (montante de Piracicaba) teve valor médio mais baixo do que o permitido pela legislação. A razão para isso pode ser decorrente da influência tanto das indústrias como de esgotos sanitários provenientes da montante e da cidade de Americana. Embora o oxigênio dissolvido tenha diminuído à jusante de Americana comparada à montante, este valor esteve dentro do permitido pela legislação ambiental.

Para condutividade, valores mais altos foram observados nos pontos 2, 3, 4 e 5 (Tabela 1). Altos valores de condutividade são esperados quando amostras de água são

coletadas próximas à locais com influência de esgotos industriais e sanitários, como é o caso destes quatro pontos.

O impacto antropogênico em um rio também pode ser avaliado pela demanda bioquímica de oxigênio (DBO). Baixos valores de DBO foram observados nos pontos 1 e 6 comparado aos outros locais (Tabela 1). De acordo com o CONAMA (2005), rios brasileiros não deveriam ter DBO maior que 5 mg L^{-1} (BRASIL, 2005) e provavelmente o motivo para os baixos valores neste locais pode ser devido à depuração da matéria orgânica na Represa de Americana a na de Barra Bonita.

Tabela 1 - Média, desvio padrão, mínimo e máximo valores e coeficiente de variação da temperatura do ar (TA) (ºC), temperatura da água (TAG) (ºC), pH, condutividade (CDT) (µS cm^{-1}), oxigênio dissolvido (OD) (mg L^{-1}), e demanda bioquímica de oxigênio (DBO) (mg L^{-1}), observados durante o período do estudo

Pontos	TA	TAG	pH	CDT	OD	DBO
1	22,83± 3,92 14,70 – 29,00 (17,17)	22,03 ± 3,17 17,20 – 26,90 (14,38)	6,75± 0,54 5,97 – 7,43 (8,0)	135,73±54,18 64,20 – 225,30 (39,91)	8,00±1,83 5,9 – 9,71 (22,87)	4,27± 3,21 0,63 – 10,47 (75,17)
2	25,14± 4,50 16,70 – 29,50 (17,89)	22,60 ± 2,96 17,00 – 26,20 (13,09)	7,10± 0,32 6,38 – 7,49 (4,50)	180,74± 79,72 70,90 – 359,50 (44,10)	6,42 ± 2,04 4,10 – 10,49 (31,77)	7,91± 4,15 2,47 – 17,23 (52,46)
3	26,07± 4,28 16,30 – 30,40 (16,41)	22,75 ± 2,93 17,4 – 26,30 (12,87)	6,98± 0,72 4,90 – 7,52 (10,31)	173,32± 79,59 70,60 – 366,66 (45,92)	5,40 ± 1,62 3,80 – 8,60 (30,00)	7,17± 3,91 1,63 – 12,19 (54,53)
4	27,06± 4,54 16,90 – 32,40 (16,77)	23,02 ± 2,95 17,60 – 26,60 (12,81)	7,34± 0,34 6,65 – 7,74 (4,63)	179,33± 77,14 80,10 – 366,30 (43,01)	8,92 ± 2,17 3,58 – 11,97 (24,32)	8,78± 5,17 3,24 – 17,01 (58,88)
5	26,53± 4,15 15,60 – 32,00 (15,64)	23,08 ± 3,38 16,90 – 27,40 (14,64)	7,34± 0,31 6,92 – 7,69 (4,22)	168,54± 68,54 69,10 – 338,30 (40,66)	7,49 ± 2,09 3,30 – 10,26 (27,90)	7,81± 3,95 2,92 – 13,57 (50,57)
6	28,00± 4,09 17,10 – 32,80 (14,60)	24,57 ± 3,22 18,40 – 27,40 (13,10)	7,50± 0,76 6,80 – 9,62 (10,13)	144,71± 44,50 78,50 – 217,01 (30,75)	8,26 ± 2,77 3,02 – 14,33 (33,53)	4,10± 3,50 0,26 – 13,56 (85,36)

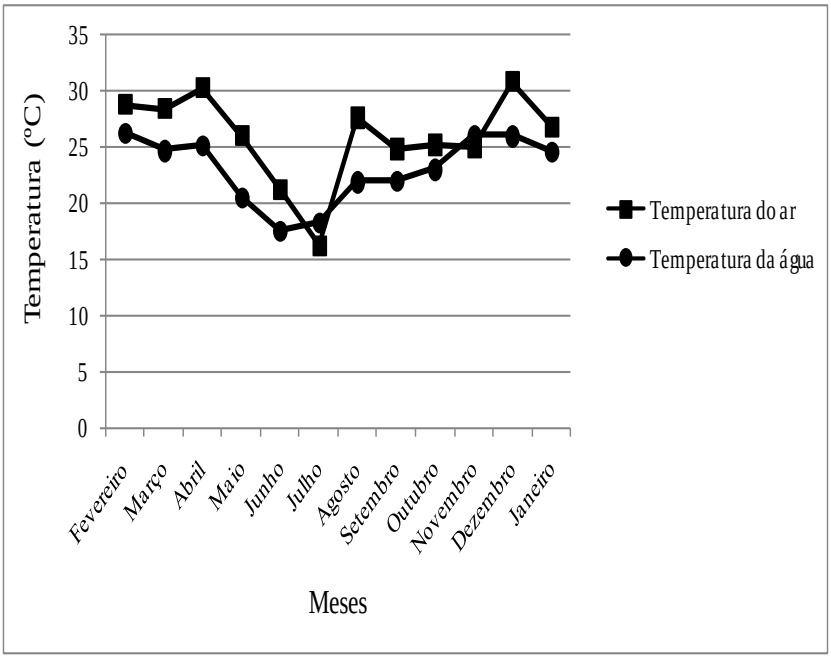

Figura 3 - Temperatura (ºC) do ar e da água durante os meses de amostragem de água do rio Piracicaba.

3.3.3 Teste de toxicidade crônica com *C. dubia* e *C. silvestrii*

O valor médio da CL_{50} (48h) do NaCl para *C. dubia* e *C. silvestrii* para todos os meses foram 1,76 (±0,16) e 1,68 (±0,21) g L^{-1}, respectivamente. Estes valores estiveram dentro do limite de variabilidade (média ±2 desvio padrão) considerado aceitável pelos protocolos atuais (ABNT, 2005), e através deles ficou evidenciada sensibilidade parecida entre *C. dubia* e *C. silvestrii* ao Nacl.

A água foi considerada tóxica para os organismos quando a média da reprodução foi significativamente menor comparada com o controle ($p<0,05$). No primeiro mês de avaliação (fevereiro), da montante para a jusante da cidade de Piracicaba (pontos 3 e 4, respectivamente) a água foi tóxica para ambas as espécies. Os mesmos resultados foram observados em março em todos os meses de amostragens para *C. silvestrii* e no ponto 5 para *C. dubia*. Durante os meses de abril a dezembro de 2011 não foi observada toxicidade para ambas as espécies. Em janeiro de 2012, a água coletada dos pontos 1 ao 4 (entre a montante de Americana e a jusante de Piracicaba) apresentaram toxicidade para *C. silvestrii* e a dos pontos 1 e 5 para *C. dubia*. De acordo com os resultados obtidos, observou-se maior efeito tóxico para *C. silvestrii*, uma vez que sua reprodução foi afetada pela água coletada na maioria dos pontos de amostragens em março de 2011 e janeiro de 2012.

Os resultados do teste crônico parecem estar associados com a precipitação na bacia do rio Piracicaba durante o período do estudo. Sabe-se que durante os períodos de chuvas, a contaminação dos ambientes aquáticos aumenta devido à maior disponibilidade de xenobióticos, tais como metais, pesticidas, e nutrientes derivados dos campos agrícolas e dos ambientes urbanos. Meche et al. (2010) observaram que o nível de 10 dos 14 metais analisados (Al, As, Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Mo, Sr e Zn) em peixes coletados no rio Piracicaba foi mais alto na estação chuvosa, e desta forma, os autores concluíram que a chuva pode ter lavado o solo e os ambientes urbanos contaminado com metais para dentro do rio. Armas et al. (2007) avaliaram a ocorrência de herbicidas em águas superficiais e sedimentos do rio Corumbataí, um tributário do rio Piracicaba, e observaram uma maior ocorrência de herbicidas (atrazina, ametrina, simazina, glifosato e clomazona) em concentrações mais elevadas durante a estação chuvosa, reforçando que o escoamento superficial é uma importante via de entrada de contaminantes nos ambientes aquáticos. Do leste à parte central da bacia do rio Piracicaba, o principal uso da terra são as pastagens e a silvicultura, com predominância de cana-de-açúcar da parte central à ocidental (FOSTIER et al., 2005), áreas que são caracterizadas pelo uso extensivo de herbicidas.

Março e outubro de 2011 e janeiro de 2012 tiveram maiores valores de precipitação (Figura 2). Exceto para outubro, amostras de água coletada em janeiro e março foi tóxica para *C. silvestrii* em todos os pontos de amostragens e nos pontos 1, 2, 3 e 4 (montante e jusante de Americana e montante e jusante de Piracicaba, respectivamente) (Tabela 2). Em março, a precipitação foi de 255 mm (a segunda maior), e isto pode explicar o efeito crônico. Para *C. dubia*, a toxicidade foi observada em março (ponto 5) e em janeiro (pontos 1 e 5) (Tabela 3). Em fevereiro, embora a precipitação fosse menor comparada a março e janeiro, neste mês houve a primeira chuva do ano e uma lavagem de ambientes urbanos e agrícolas acumulados de agentes químicos para o rio Piracicaba pode ter ocorrido contribuindo para a toxicidade das amostras coletadas nos pontos 3 e 4 para ambos os microcrustáceos (Tabelas 2 e 3).

Tabela 2 - Valores médios de reprodução de *C. silvestrii* após exposição à água do rio Piracicaba coletada em diferentes locais de amostragens durante o período de fevereiro de 2011 a janeiro de 2012

	Meses											
Tratamentos	**Fev**	**Mar**	**Abr**	**Mai**	**Jun**	**Jul**	**Ago**	**Set**	**Out**	**Nov**	**Dez**	**Jan**
Controle	17,70^{a}	16,70^{a}	17,80^{ab}	16,50^{b}	16,53^{b}	16,70^{b}	16,72^{b}	16,50^{ab}	18,10^{a}	16,70^{b}	16,50^{ab}	16,40^{a}
Ponto 1	22,40^{a}	8,00b*	19,44^{ab}	27,44^{a}	18,63^{a}	20,70^{ab}	19,60^{ab}	17,50^{a}	17,20^{a}	17,30^{b}	16,30^{ab}	9,44^{b*}
Ponto 2	19,89^{a}	8,80b*	24,30^{a}	23,56^{ab}	23,50^{ab}	24,90^{ab}	24,00^{ab}	22,40^{a}	16,80^{a}	22,90^{ab}	22,20^{a}	9,50^{b*}
Ponto 3	3,20^{b*}	6,70b*	19,00^{ab}	20,80^{ab}	20,80^{ab}	22,80^{ab}	23,10^{ab}	20,67^{a}	17,11^{a}	21,78^{ab}	18,80^{ab}	9,50^{b*}
Ponto 4	3,60^{b*}	8,70b*	16,70^{b}	23,60^{ab}	22,70^{ab}	25,50^{ab}	24,78^{a}	22,67^{a}	15,40^{a}	20,33^{ab}	19,50^{ab}	9,33^{b*}
Ponto 5	19,40^{a}	3,56b*	14,80^{b}	21,60^{ab}	21,90^{ab}	27,50^{a}	25,90^{a}	19,50^{a}	12,67^{a}	25,44^{a}	18,00^{ab}	11,71^{ab}
Ponto 6	21,89^{a}	8,80b*	17,44^{ab}	16,30^{b}	20,11^{b}	20,30^{b}	20,80^{ab}	9,33^{b}	16,40^{a}	17,78^{b}	13,10^{b}	13,55^{ab}

*Tóxico. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Dunett com p<0,05.

Tabela 3 - Valores médios da reprodução de *C. dubia* após exposição à água do rio Piracicaba coletada em diferentes locais de amostragens durante o período de fevereiro de 2011 a janeiro de 2012

	Meses											
Tratamentos	**Fev**	**Mar**	**Abr**	**Mai**	**Jun**	**Jul**	**Ago**	**Set**	**Out**	**Nov**	**Dez**	**Jan**
Controle	23,10^{ab}	16,70^{a}	17,30^{a}	18,10^{b}	16,80^{b}	17,30^{b}	16,50^{b}	16,50^{b}	17,80^{a}	16,70^{b}	16,50^{a}	16,20^{a}
Ponto 1	17,89^{b}	12,00^{ab}	17,50^{a}	18,40^{b}	17,75^{ab}	20,89^{ab}	19,67^{ab}	26,25^{a}	13,80^{a}	13,13^{b}	16,90^{a}	9,33^{b*}
Ponto 2	19,88^{ab}	13,20^{a}	21,70^{a}	28,50^{a}	25,40^{a}	25,22^{a}	24,60^{a}	22,78^{ab}	17,80^{a}	24,88^{a}	17,60^{a}	12,90^{ab}
Ponto 3	2,70^{c*}	10,22^{ab}	15,56^{a}	22,40^{ab}	23,60^{ab}	23,70^{ab}	22,00^{ab}	27,90^{a}	16,00^{a}	19,70^{ab}	17,00^{a}	10,90^{ab}
Ponto 4	6,30^{c*}	10,89^{ab}	15,70^{a}	23,80^{ab}	23,33^{ab}	24,40^{ab}	22,90^{ab}	22,90^{ab}	13,78^{a}	19,70^{ab}	16,30^{a}	10,80^{ab}
Ponto 5	21,78^{ab}	5,20b*	16,60^{a}	21,00^{b}	21,56^{ab}	24,50^{ab}	22,13^{ab}	20,56^{ab}	14,33^{a}	19,20^{ab}	16,00^{a}	9,90^{b*}
Ponto 6	26,88^{a}	11,33^{ab}	16,40^{a}	17,30^{b}	17,50^{ab}	20,10^{ab}	15,11^{b}	11,00^{b}	15,80^{a}	14,70^{b}	12,80^{a}	11,20^{ab}

*Tóxico. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Dunett com p<0,05.

3.3.4 Mortalidade e avaliação histopatológica das brânquias de *D. rerio*

Durante o estudo não foi observada mortalidade no grupo controle. Em contraste, a água coletada em alguns locais promoveu mortalidade em fevereiro, março, abril, maio, junho, setembro, outubro e novembro de 2011 (Tabela 4). Os maiores valores de mortalidade foram observados em outubro no ponto 1.

Tabela 4 - Mortalidade (%) de *D. rerio* após exposição (96h) à água do rio Piracicaba coletada durante fevereiro de 2011 a janeiro de 2012

	Período de amostragem											
Tratamentos	**Fev**	**Mar**	**Abr**	**Mai**	**Jun**	**Jul**	**Ago**	**Set**	**Out**	**Nov**	**Dez**	**Jan**
Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ponto 1	0	10	10	0	0	0	0	0	30	10	0	0
Ponto 2	0	0	10	10	0	0	0	0	0	10	0	0
Ponto 3	0	0	10	0	0	0	0	0	0	10	0	0
Ponto 4	0	0	20	0	0	0	0	10	20	10	0	0
Ponto 5	20	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ponto 6	10	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0

A contaminação dos ambientes aquáticos pode causar severas alterações morfológicas e fisiológicas nos organismos (MAZON et al., 1999), e um dos métodos para avaliar os efeitos de poluentes em peixes é examinar seus órgãos quanto às alterações morfológicas (POLEKSIC; MITROVIC-TUTUNDZIC, 1994). As brânquias dos peixes são órgãos sensíveis que podem ser facilmente danificados por poluentes mesmo em baixas concentrações (KARLSSON, 1983), e desta forma, as análises histopatológicas desses órgãos têm sido utilizadas como ferramenta para avaliar a qualidade dos ecossistemas aquáticos (JAGOE; HAINES, 1997; TEH; ADANS; HINTON, 1997; CAMARGO; MARTINEZ, 2007; ELAHEE; BHAGWANT, 2007; FLORES-LOPEZ; THOMAZ, 2011; NASCIMENTO et al., 2011).

Durante o período do estudo, as alterações encontradas nas brânquias foram: hiperplasia, fusão lamelar, deslocamento epitelial, presença de células mucosas e de cloreto nas lamelas secundárias, congestão sanguínea, e aneurisma (Figura 4). As alterações mais comuns foram hiperplasia que provavelmente induziu a fusão das lamelas e deslocamento epitelial. De acordo com Mohamed (2009), essas alterações são mecanismo de defesa do

organismo contra a entrada de poluentes, uma vez que, há aumento da distância entre o ambiente externo e o sangue.

Após a exposição à água do rio Piracicaba, a maioria das alterações observadas foram classificadas como de estágio I, embora aneurisma lamelar, alteração classificada como de estágio II foi observada em após exposição a amostras de água coletada em alguns pontos no mês de fevereiro, abril, maio, julho, setembro, outubro e dezembro de 2011.

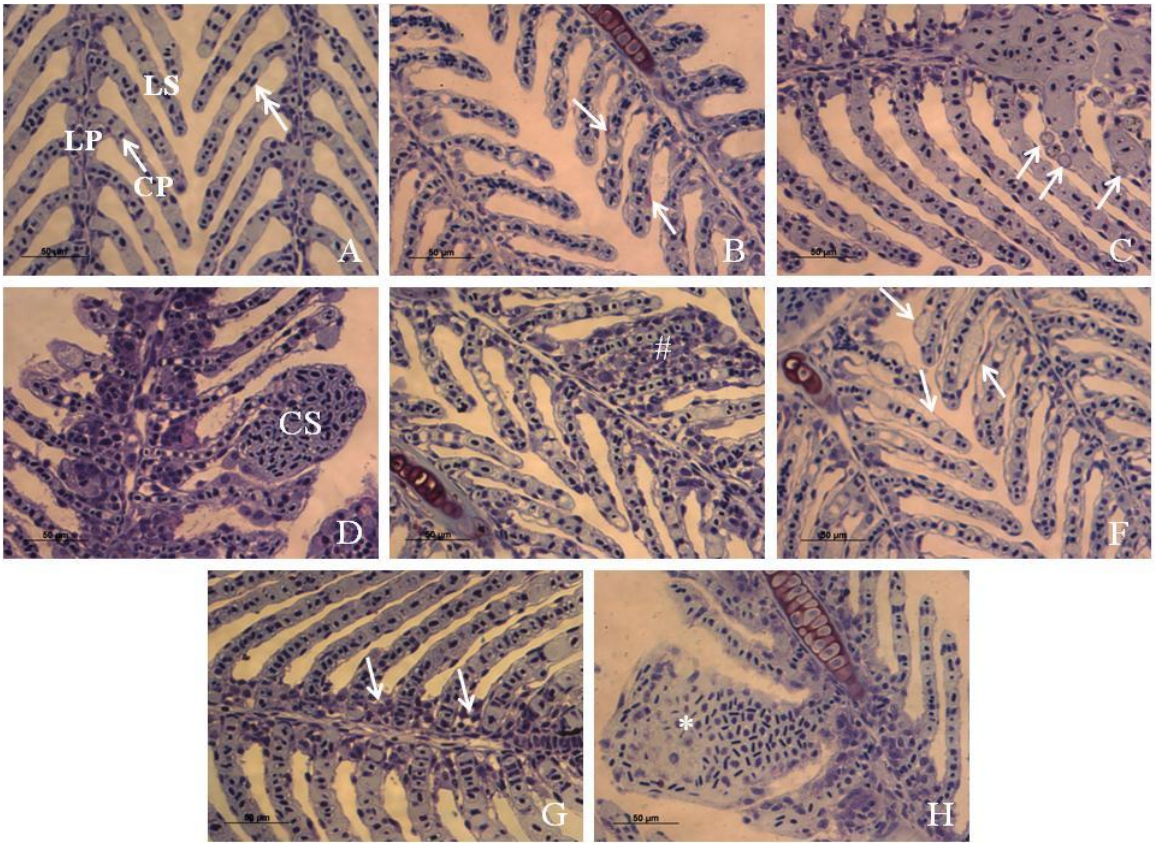

Figura 4 - Histopatologias encontradas em brânquias de *D. rerio* após exposição (96 horas) à água do rio Piracicaba coletada em diferentes pontos de amostragens durante fevereiro de 2011 a janeiro de 2012. (A) Grupo controle. Observar o epitélio achatado na lamela (seta dupla), lamela primária (LP), lamela secundária (LS) e célula pilar (CP). (B-H) Brânquias de *D. rerio* expostas à água do rio Piracicaba. Notar a presença de células mucosas em B (seta), células de cloreto em C (seta), congestão de sangue em D (CS), fusão lamelar em E (#), deslocamento epitelial em F (seta), hiperplasia em G (seta), e aneurisma em H (*)

Apesar do aparecimento de aneurismas, somente para os meses de fevereiro, setembro e outubro o IAH apresentou diferença significativa ($p<0,05$) em alguns pontos de amostragens comparados com o grupo controle (Figuras 5, 6 e 7). Apesar dessa diferença, peixes expostos à água coletada nesses pontos apresentaram IAH das brânquias menor que 10, e assim como nos demais meses mostraram função normal. A formação de aneurismas está relacionada à ruptura das células pilares (HEATH, 1987; MARTINEZ et al., 2004) devido ao grande fluxo de sangue, ou mesmo, por causa dos efeitos direto de contaminantes. Desta forma, de acordo com Poleksic e Mitrovic-Tutundzic (1994) essa é uma alteração severa que pode ser revertida quando possível, porém, mais difícil do que as alterações epiteliais.

Os valores de VMA foram significativamente diferentes para brânquias do grupo controle em fevereiro (pontos 1, 4, 5 e 6), e neste caso, quando exposta à água coletadas nos pontos 1 e 6 observou-se valores próximos a 2 (Figura 4). Estes resultados indicam que as alterações foram pontualmente localizadas, diferentemente para aquelas observadas quando expostas à água dos pontos 4 e 5 que foram classificadas como dispersas (VMA=2). Para os outros meses, não houve diferença significativa comparada com o controle, embora na maioria deles, a água coletada em quase todos os pontos de amostragens promoveu valores de VMA próximos a 2 indicando assim alterações pontualmente localizadas (Figuras 5, 6 e 7).

Devido à importância das brânquias na respiração e na regulação iônica nos peixes, pesquisas têm focado sobre a investigação dos efeitos causados pelas mudanças ambientais sobre este órgão (DE LA TORRE; FERRARI; SALIBIÁN, 2005; NIGRO et al., 2006). De acordo com Olivera Ribeiro et al. (2005), as brânquias são ferramentas eficientes no biomonitoramento devido à sua ampla área superficial que fica em contato com a água e permeabilidade (ARELLANO et al., 2004; EVANS; PIERMARINI; CHOE, 2005; VIGLIANO et al., 2006), e desta forma, impactos ambientais causados por poluentes podem afetar as suas funções (SCHWAIGER et al., 1997; TEH; ADANS; HINTON, 1997).

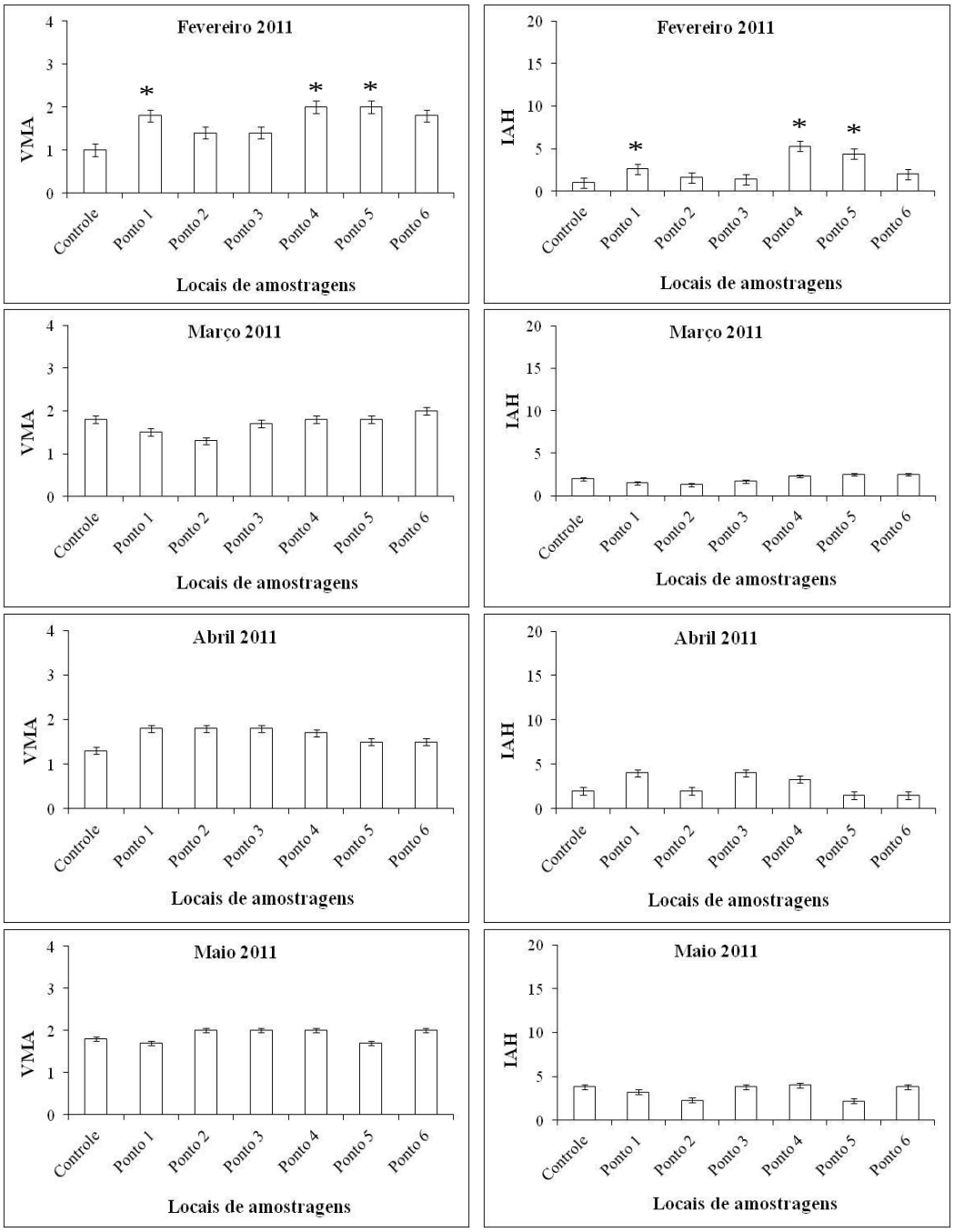

Figura 5 - VMA e IAH das brânquias de *D. rerio* após exposição (96 horas) à água do rio Piracicaba coletada em diferentes locais de amostragens durante fevereiro a maio de 2011. *Estatisticamente diferente comparado com o controle pelo teste de Dunnett ($p<0.05$).

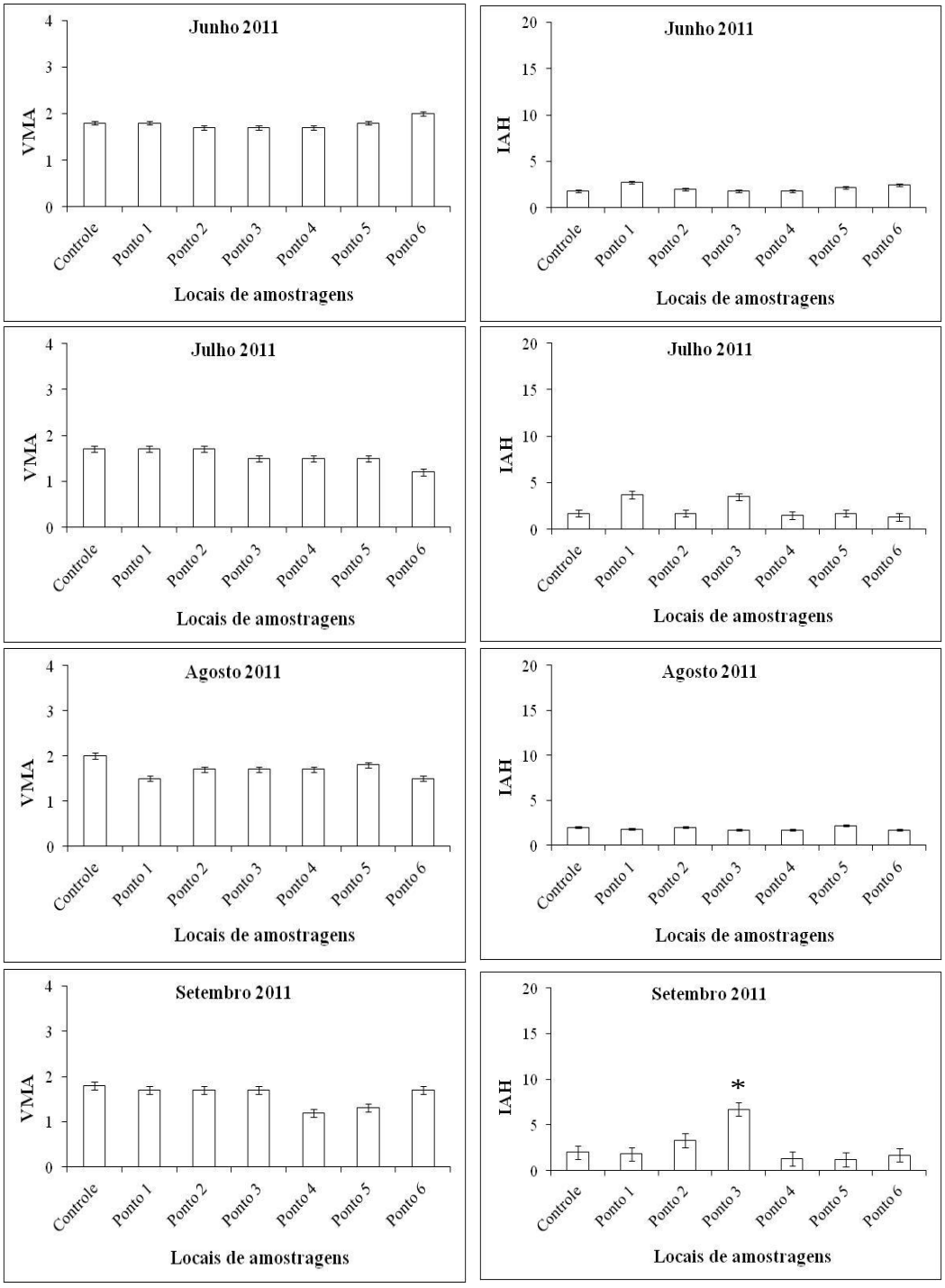

Figura 6 - VMA e IAH das brânquias de *D. rerio* após exposição (96 horas) à água do rio Piracicaba coletada em diferentes locais de amostragens durante junho a setembro de 2011. *Estatisticamente diferente comparado com o controle pelo teste de Dunnett ($p<0.05$).

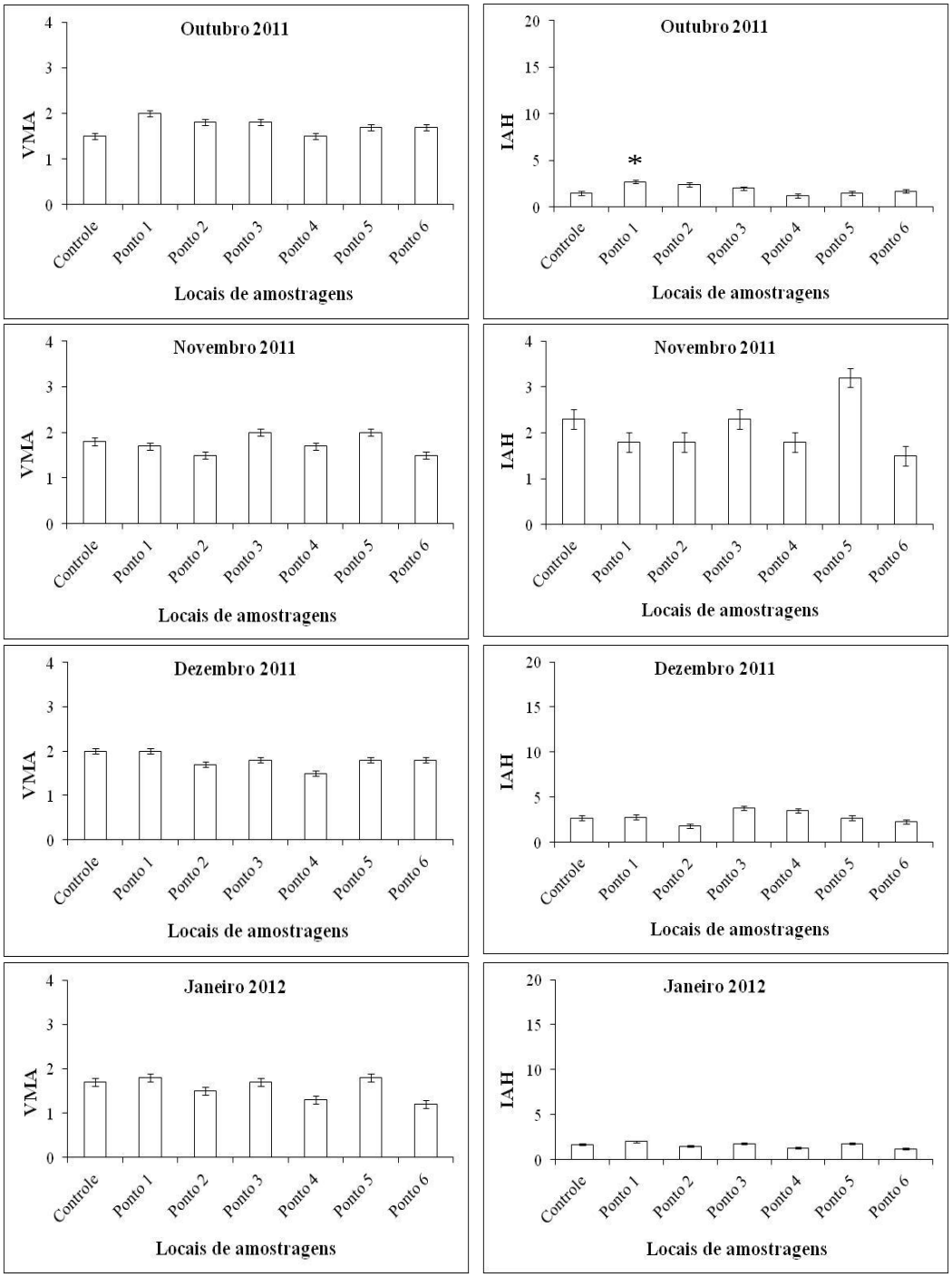

Figura 7 - VMA e IAH das brânquias de *D. rerio* após exposição (96 horas) à água do rio Piracicaba coletada em diferentes locais de amostragens durante o período de outubro de 2011 a janeiro de 2012. *Estatisticamente diferente comparado com o controle pelo teste de Dunnett ($p<0.05$).

Quando os organismos são expostos à água de rios, dificilmente pode-se atribuir a toxicidade a um contaminante específico, já que os ambientes aquáticos são compostos de uma complexa mistura de produtos. No caso da bacia do rio Piracicaba, muitas substâncias químicos como metais pesados têm sido detectados em água, sedimentos e peixes (FAVARO et al., 2004; FOSTIER et al., 2005; FRANÇA et al., 2010). Meche et al. (2010) encontraram níveis (0,05 a 1,52 ppm) de cromo (Cr) em diferentes espécies de peixes na bacia do rio Piracicaba. Domingues et al. (2010) conduziram um estudo sobre a toxicidade do cromo VI sobre adultos de *D. rerio* e não observaram alterações sobre os níveis enzimáticos para acetilcolinesterase (AChE) e lactase desidrogenase (LDH) nas concentrações de 21, 32 e 42 ppm, diferentemente para glutationa – S – transferase (GST) que apresentou toxicidade na concentração mais alta. Diferentemente das enzimas, neste mesmo estudo as mesmas concentrações causaram dano no DNA de *D. rerio*.

Em relação ao estudo de Meche et al. (2010), 8 das 17 espécies de peixes apresentaram níveis de níquel (Ni) acima de 1 ppm. Kinle, Kohler e Gerhardt (2009) conduziram um experimento agudo com *D. rerio* (2 horas de exposição com organismos com idade de 5 dias após a fertilização) utilizando cloreto de níquel ($NiCl_2$) nas seguintes concentrações: 0,0; 0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 15,0 e 1000 mg L^{-1} e não observaram efeitos sobre o comportamento e deformações morfológicas.

Além de metais, herbicidas tais como atrazina, ametrina, simazina, hexazinona, glifosato e clomazona foram relatados no rio Corumbataí (tributário do rio Piracicaba) por Armas et al. (2007). Zhu et al. (2011) investigaram os efeitos do atrazina sobre o DNA de machos e de fêmeas de *D. rerio* nas concentrações de 0,0; 0,01; 0,1 e 1,0 mg L^{-1} por 5, 10, 15, 20 e 25 dias e observaram um aumento dos danos com o aumento das concentrações do atrazina, indicando a genotoxicidade deste herbicida.

A variedade de mudanças histopatológicas observadas nas brânquias no presente estudo indica que *D. rerio* respondeu aos efeitos diretos de contaminantes presentes na água do rio Piracicaba, embora na maioria dos meses as brânquias não apresentaram diferença significativa em relação ao controle. Comparando a toxicidade observada sobre os organismos testados, amostras de água coletadas em fevereiro de 2011 foram as únicas que causaram toxicidade para os três organismos em alguns pontos de amostragem. Em relação à sensibilidade dos organismos à água do rio Piracicaba em termos de tempo e locais de amostragem, *C. silvestrii* foi mais sensível que *C. dubia* e *D. rerio* já que para *C. silvestrii* observou-se toxicidade em onze locais de amostragem (fevereiro nos pontos 3 e 4, março nos pontos 1, 2, 3, 4 e 5, e janeiro nos pontos 1, 2, 3 e 4), diferentemente para *C. dubia* (fevereiro

nos pontos 3 e 4, março no ponto 5 e janeiro nos pontos 1 e 5) e *D. rerio* (fevereiro nos pontos 1, 4 e 5, setembro no ponto 3 e outubro no ponto 1).

3.4. Conclusão

Este estudo mostrou que de acordo com os parâmetros físicos e químicos (condutividade e demanda bioquímica de oxigênio), amostras de água demonstraram baixa qualidade em locais próximos à Americana e Piracicaba. De acordo com o ensaio crônico, observou-se toxicidade para *C. silvestrii* e *C. dubia* nos meses com alta precipitação, e desta forma, a toxicidade parece estar associada com o escoamento superficial de contaminantes provenientes das áreas agrícolas e ambientes urbanos. Embora alterações histopatológicas fossem observadas nas brânquias de *D. rerio* em todos os pontos de amostragem, estas não se diferiram em relação àquelas encontradas para o grupo controle, exceto em fevereiro, setembro e outubro para algumas localidades. A utilização de organismos de diferentes níveis tróficos assim como o uso de espécies nativas, mostrou ser uma ferramenta efeciente no monitoramento de ambientes aquáticos, e desta forma, recomendamos que *C. silvestrii* seja utilizada em estudos de monitoramento ambiental realizados em ecossistemas aquáticos brasileiros.

Referências

ARMAS, E.D.; MONTEIRO, R.T.R.; ANTUNES, P.M.; SANTOS, M.A.P.F.; CAMARGO, P.B.; ABAKERLI, R.B. Diagnóstico espaço temporal da ocorrência de herbicidas nas águas superficiais e sedimentos do Rio Corumbataí e principais afluentes. **Quimica Nova**, São Paulo, v. 30, n.5, p. 1119-1127, 2007.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **Standard guide for conducting three-brood renewal toxicity tests with *Ceriodaphnia dubia***. Philadelphia: ASTM, 1992. 20 p.

ARELLANO, J.M.; STORCH, V.; SARASQUETE, C. Ultrastructural and histochemical study on gills and skin of the Senegal sole, *Solea senegalensis*. **Journal of Applied Ichthyology**, Hamburg, v. 20, n.6, p. 452–460, 2004.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Determinação da demanda bioquímica de oxigênio (DBO):** método de incubação (20°C, cinco dias). Rio de Janeiro: ABNT, 1992. 5p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica - Método de ensaio com *Ceriodaphnia* ssp (Crustácea – Cladocera)**. Rio de Janeiro: ABNT, 2005. 13 p.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for the examination of water and wastewater**, 20th ed. New York: American Public Health Association, 1998.

BALLESTER, M.V.; MARTINELLI, L.A.; KRUSCHE, A.V.; VICTORIA, R.L.; BERNARDES, M.; CAMARGO, P.B. Effects of increasing organic matter loading on the dissolved O2, free dissolved CO2 e respiration rates in the Piracicaba river basin, southeast Brazil. **Water Research**, Oxford, v. 33, n.9, p. 2119– 2129, 1999.

CAIRNS, J.JR. Environmental monitoring for the preservation of global biodiversity: The role in sustainable use of the planet. **International Journal of Sustainable Development and World Ecology**, London, v. 9, p. 135-150, 2022.

CAMARGO, M.M.P.; MARTINEZ, C.B.R. Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream. **Neotropical ichthyology**, São Paulo, v. 5, n.3, p. 327-336, 2007.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução n.357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências**. Brasilia: CONAMA, 2005. 27p.

DANIEL, M.H.B.; MONTEBELO, A.A.; BERNARDES, M.C.; OMETTO, J.P.H.B.; CAMARGO, P.B.; KRUSCHE, A.V.; BALLESTER, M.V.; VICTORIA, R.L.; MARTINELLI, L.A. Effects of urban sewage on dissolved oxygen, dissolved inorganic and organic carbon, and electrical conductivity of small streams along a gradient of urbanization in the Piracicaba River Basin. **Water, Air and Soil Pollution**, Dordrecht, v. 136, n.1-4, p. 189–206, 2002.

DE LA TORRE, F.R.; FERRARI, L.; SALIBIÁN, A. Biomarkers of a native fish species (*Cnesterodon decemmaculatus*) application to the water toxicity assessment of a peri-urban polluted river of Argentina**. Chemosphere**, Oxford, v. 59, n.4, p. 577–583, 2005.

DOMINGUES, I.; OLIVEIRA, R.; LOURENÇO, J.; GRISOLIA, C.K.; MENDO, S.; SOARES, A.M. Biomarkers as a tool to assess effects of chromium (VI): comparison of responses in zebrafish early life stages e adults. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Phamarcology,** Oxford, v. 152, n.3, p. 338-345, 2010.

DONOHUE, I.; STYLE, D.; COXON, C.; IRVINE, K. Importance of spatial and temporal patterns for assessment of risk of diffuse nutrient emissions to surface waters. **Journal of Hydrology**, Amsterdam, v. 304, n.1-4, p. 183–192, 2006.

ELAHEE, K.B.; BHAGWANT, S. Hematological and gill histopathological parameters of three tropical fish species from a polluted lagoon on the west coast of Mauritius. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 68, n.3, p. 361–371, 2007.

EVANS, D.H.; PIERMARINI, P.M.; CHOE, K.P. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 85, n. 1, p. 97–177, 2005.

FAVARO, P.C.; DE NADAI FERNEES, E.A.; FERRAZ, E.S.B.; FALOTICO, M.H.B. Time still to restore the polluted Piracicaba river basin. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, Dordrecht, v. 259, n. 2, p. 217.221, 2004.

FONSECA, A.L.; ROCHA, O. The life-cycle of *Ceriodaphnia silvestrii* Daday, 1902, a neotropical endemic species (Crustacea, Cladocera, Daphnidae). **Acta Limnologica Brasiliensia**, Rio Claro, v. 16, n.4, p. 319–328, 2004.

FORGET, G.; GAGNON, P.; SANCHEZ, W.A.; DUTKA, B.J. Overview of methods and results of the eight countries International Development Research Centre (IDRC) WaterTox Project. **Environmental Toxicology**, New York, v. 15, n.4, p. 264–276, 2000.

FOSTIER, A.H.; FALÓTICO, M.B.; FERRAZ, E.S.B.; TOMAZELLI, A.C.; SALOMÃO, M.S.M.B.; MARTINELLI, L.A.; VICTORIA, R.L. Impact of anthropogenic activity on the hg concentrations in the Piracicaba river basin (São Paulo State, Brazil). **Water, Air, and Soil Pollution**, Dordrecht, v. 381, n.1-4, p. 381–402, 2005.

FLORES-LOPEZ, F.; THOMAZ, A.T. Histopathologic alterations observed in fish gills as a tool in environmental monitoring. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 71, n.1, p. 179-188, 2011.

FRANÇA, E.J.; FERNANDES, E.A.N.; CAVALCANTE, I.P.O.; FONSECA, F.Y.; CAMILLI, L.; RODRIGUES, V.S.; BARDINI JUNIOR, C.; FERREIRA, J.R.; BACCHI, M.A. Characterizing suspended sediments from the Piracicaba River Basin by means of k_0–INAA. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research. Section A.** Accelerators Spectrometers Detectors And Associated Equipment, Amsterdam, v. 62, n. 2, p. 479-483, 2010.

HAMILTOM, M.A.; RUSSO, R.C.; THURSTON, V. Trimed Spearman-Karber method for estimating medial lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environmental Science and Technology**, Washington, v. 11, n.7, p. 714-719, 1977.

HEATH, A.G. **Water pollution and fish physiology**. Boca Raton: CRC Press, 1987. 245 p.

JAGOE, C.H.; HAINES, T.A. Changes in gills morphology of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Smolts due to addition of acid and aluminum to stream water. **Environmental Pollution**, Amsterdam, v. 97, n.1-2, p. 137-146, 1997.

KARLSSON, L. Gill morphology in the zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan). **Journal of Fish Biology**, London, v. 23, n.5, p. 511-524, 1983.

KINLE, C.; KOHLER, H.R.; GERHARDT, A. Behavioural and developmental **toxicity** of chlorpyrifos and **nickel** chloride to **zebrafish** (***Danio rerio***) embryos and larvae. Ecotoxicology and Environmental Safety, New York, v. 72, n.6, p. 1740-1747, 2009.

KRUSCHE, A.V.; CARVALHO, F.P.; MORAES, J.M.; CAMARGO, P.B.; BALLESTER, M.V.R.; HORNINK, S.; MARTINELLI, L.A.; VICTORIA, R.L. Spatial and temporal water quality variability in the Piracicaba River Basin, Brazil. **Journal of the American Water Resources Assossiation**, Herndon, v. 33, n.5, p. 1117–1123, 1997.

KRUSCHE, A.V.; MARTINELLI, L.A.; VICTORIA, R.L.; BERNARDES, M.; CAMARGO, P.B.; BALLESTER, M.V.; TRUMBORE, S.E. Composition of particulate and dissolved organic matter in a disturbed watershed of southeast Brazil (Piracicaba River Basin). **Water Research**, Oxford, v. 36, n.11, p. 2743–2752, 2002.

MARTINELLI, L.A.; KRUSCHE, A.V.; VICTORIA, R.L.; CAMARGO, P.B.; BERNARDES, M.; FERRAZ, E.S.; MORAES, J.M.; BALLESTER, M.V. Effects of sewage on the chemical composition of Piracicaba River, Brazil. **Water, Air and Soil Pollution**, Dordrecht, v. 110, n.1-2, p. 67–79, 1999a.

MARTINELLI, L.A.; BALLESTER, M.V.; KRUSCHE, A.V.; VICTORIA, R.L.; CAMARGO P.B.; BERNARDES, M.; OMETTO, J.P.H.B. Landcover changes and δ13C composition of riverine particulate organic matter in the Piracicaba river basin (Southeast region of Brazil). **Limnology and Oceanography**, Waco, v. 44, n.7, p. 1826–1833, 1999b.

MARTINEZ, C.B.R.; NAGAE, M.Y.; ZAIA, C.T.B.V.; ZAIA, D.A.M. Morphological and physiological acute effects of lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 64, n.4, p. 797-807, 2004.

MAZON, A.F.; CERQUEIRA, C.C.C.; MONTEIRO, E.A.S.; FERNANDES, M.N. **Acute copper exposure in freshwater fish:** morphological and physiological effect. In: VAL, A.L.; ALMEIDA-VAL, V.M.F. (Eds). Biology of tropical fishes. Manaus: INPA, 1999. p.263-275.

MECHE, A.; MARTINS, M.C.; LOFRANO, B.E.S.N.; HARDAWAY, C.J.; MERCHANT, M.; VERDADE, L. Determination of heavy metals by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry in fish from the Piracicaba River in Southern Brazil. **Microchemical Journal**, New York, v. 94, n.2, p. 171–174, 2010.

MOHAMED, F.A.S. Histopathological studies on *Tilapia zilli* and *Sole vulgaris* from lake Qarun, Egypt. **World Journal of Fish and Marine Science**, Deira, v. 1, n.1, p. 29-39, 2009.

NASCIMENTO, A.A.; ARAÚJO, F.G.; GOMES, I.D.; MENDES, R.M.M.; SALES, A. Fish gills alterations as potential biomarkers of environmental quality in a eutrophized tropical river in South-Eastern Brazil. **Anatomia, Histologia e Embryologia**, New York, v. 41, n.3, p. 209–216, 2012.

NIGRO, M.; FALLENI, A.; DEL BARGA, I.; SCARCELLI, V.; LUCCHESI, P.; REGOLI, F.; FRENZILLI, G. Cellular biomarkers for monitoring estuarine environments: transplanted versus native mussels. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 77, n.4, p. 339–347, 2006.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Guidelines 203 for testing of chemicals**: fish, acute toxicity test; effects on biotic systems. Paris: OECD, 1992. 9 p.

OLIVEIRA RIBEIRO, C.A.; VOLLAIRE, Y.; SANCHEZ-CHARDI, A.; ROCHE, H. Bioaccumulation and the effects of organochlorine pesticides, PAH and heavy metals in the Eel (*Anguilla anguilla*) at the Camargue Nature Reserve, France. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 74, n.1, p. 53–69, 2005.

POLEKSIC, V.; MITROVIC-TUTUNDZIC, V. **Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution.** In: MULLER, R.; LLOYD, R. (Eds.). Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish. Cambridge: Cambridge University Press, 1994. p. 339–352.

SCHWAIGER, J.; WANKE, R.; ADAM, S.; PAWERT, M.; WOLFGANG, H.; TRIEBSKORN, R. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. **Journal of Aquatic Ecosystm and Stress Recovery**, Dordrecht, v. 6, n.1, p. 75–86, 1997.

TEH, S.T.; ADAMS, S.M.; HINTON, D.E. Histopathologic biomarkers in feral freshwater fish populations exposed to different types of contaminat stress. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 37, n.1, p. 51–70, 1997.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Introduction to water quality based toxics control for the NPDES program**. Washington, DC: USEPA, 1992. 9 p.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. LEWIS, P.A. et al. (Eds). **Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Water to Freshwater and Marine Organisms**, Cincinnati: USEPA, 1994. (EPA/600/4-91/002.1994).

VIGLIANO, F.A.; ALEMAN, N.; QUIROGA, M.I.; NIETO, J.M. Ultrastructural characterization of gills in juveniles of the Argentinian Silverside, *Odontesthes bonariensis* (Valenciennes, 1835) (Teleostei: Atheriniformes). **Anatomia, Histologia, Embryologia**, Berlin, v. 35, n.2, p. 76–83, 2006.

ZHU, L.; DONG, X.; XIE, H.; WANG, J.; WANG, J.; SU, J.; YU, C. DNA damage and effects on glutathione-S-transferase activity induced by atrazine exposure in zebrafish (*Danio rerio*). **Environmental Toxicology**, New York, v. 26, n.5, p. 480-488, 2011

4. AVALIAÇÃO ESPAÇO-TEMPORAL DA CLOROFILA *a* NO RIO PIRACICABA (SÃO PAULO, BRASIL) E DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE ESTADO TRÓFICO.

Resumo

Uma avaliação espaço-temporal das concentrações de clorofila *a* bem como a determinação do índice de estado trófico (IET) na água do rio Piracicaba foram realizados entre março de 2011 a janeiro de 2012. Amostras de água foram coletadas mensalmente ao longo do rio em seis pontos e analisadas. Durante o estudo, amostras de água coletadas em todos os locais de amostragens assim como em todos os meses apresentaram valores de clorofila *a* abaixo do estabelecido pela legislação ambiental brasileira. A água coletada nos meses de outubro e novembro e aquelas amostradas à montante e à jusante de Piracicaba foram as que apresentaram maiores valores de IET baseado na clorofila *a*. Pelo fato do rio Piracicaba estar localizado em uma área altamente industrializada e habitada, esperava-se observar valores de IET mais elevados nos pontos amostrados. No entanto, deve-se ressaltar que a diluição de nutrientes oriundos das atividades agrícolas e industriais além da inibição do crescimento das algas por parte de contaminantes presentes na água do rio Piracicaba pode estar associada aos baixos valores, não significando desta forma que este ambiente possua baixa produtividade e que não esteja eutrofizado.

Palavras-chave: Ambiente aquático. Clorofila *a*. Índice de Estado Trófico.

Abstract

A spatio-temporal assessement of chlorophyll *a* concentrations as well as the determination of trophic state index (TSI) were conducted in the Piracicaba River water from March 2011 to January 2012 through chlorophyll *a* concentration. Water samples were collected monthly at six differents locations and analyzed. During the study period, water samples collected in all sampling sites and in all months presented values of chlorophyll *a* below the limit set by the Brazilian environmental law. Water collected in October and November showed higher TSI and those sampled downstream and upstream of Piracicaba presented the highest values of TSI, however, were not classified as euthrofic. Due to the Piracicaba River be located in a highly populated and industrialized area, value of TSI should be higher and more frequently in the samples. The dilution of the nutrients from agricultural and industrial activities located in the Piracicaba River area in addition to the inhibition of the algae growth by contaminants may be associated with the low values, and thus, does not mean that the Piracicaba River has a low productivity.

Keywords: Aquatic environment. Chlorophyll *a*. Throfic State Index.

4.1 Introdução

Ao longo das últimas décadas, muitos ambientes de água doce têm sido contaminados. A eutrofização, que se refere ao enriquecimento por nutrientes (principalmente nitrogênio e fósforo) e matéria orgânica, tornou-se um problema de qualidade de água generalizado pelas atividades antrópicas nas bacias hidrográficas (CLOERN, 2001).

Mundialmente, a água esteticamente aceitável é uma necessidade em uma sociedade moderna, e seu comprometimento através da eutrofização pode causar efeitos econômicos negativos em países desenvolvidos e em desenvolvimento (SMITH; SCHINDLER, 2009). Com o aumento da população ao longo dos anos, espera-se que a eutrofização dos ambientes aquáticos se intensifique nas próximas décadas devido principalmente às atividades antrópicas (ELSER; BENNETT, 2011). Desta forma, o acompanhamento e avaliação da qualidade da água para estes ambientes são necessários e assim será possível traçar planos de manejo e recuperação.

As algas são componentes presentes em abundância nas comunidades planctônicas e estão envolvidas em fluxos de energia e matéria nos ecossistemas aquáticos, incluindo reservatórios, lagos, córregos, rios, pântanos e mares. Elas utilizam diretamente a energia da luz, consumem o dióxido de carbono, e produzem oxigênio (GRAHAM; GRAHAM, WILCOX, 2009). Como são organismos unicelulares com uma rápida regeneração em um curto período de tempo, as algas respondem mais rapidamente do que qualquer outro organismo quando há alteração em termos de estrutura de uma comunidade. Desta forma, estes organismos têm sido utilizados para avaliar a qualidade dos ambientes aquáticos devido à sua posição única na base de cadeias alimentares aquáticas (RAKOCEVIC-NEDOVIC; HOLLERT, 2005).

Entre algumas das várias causas da eutrofização, o uso de fertilizantes na agricultura e a descarga de efluentes industriais e domésticos não tratados merecem destaque (BOESCH, 2002), no entanto, a entrada de nutrientes pode se da naturalmente (WETZEL, 2001). Dentre suas conseqüências para o ambiente aquático estão a perda de vegetação aquática submersa, depleção de oxigênio, alteração da composição e estrutura das comunidades, além da perda de biodiversidade (GLIBERT et al., 2010).

Tais problemas para o ambiente aquático associados à eutrofização, fizeram com que este assunto fosse tratado com mais atenção (YU et al., 2011), e desta forma, ao longo dos anos, muitos métodos foram sendo desenvolvidos para avaliar o estado trófico destes ambientes (PAERL, 2009; PRIMPAS; KARYDIS, 2010; DEVLIN; BRICKER; PAINTING,

2011; FERREIRA et al., 2011). A partir dessas metodologias, vários estudos começaram a ser desenvolvidos com o objetivo de determinar o índice de estado trófico (IET) de ambientes aquáticos (ZANINI et al., 2010; YU et al., 2011; ALVES et al., 2012; YANG et al., 2012).

Em 1977, Carlson desenvolveu uma classificação do estado trófico dos ambientes aquáticos baseado em três tipos de parâmetros: concentração de clorofila *a*, transparência da água medida pelo disco de Secchi, e concentração de fósforo total. Apesar de alguns autores utilizarem todos os três parâmetros, ou apenas fósforo e clorofila *a*, segundo Carlson (1977) qualquer um deles pode ser utilizado sozinho para tal análise. Desta forma, o objetivo deste estudo foi determinar concentrações de clorofila *a* na água do rio Piracicaba (São Paulo, Brasil) para posteriormente estabelecer o IET.

4.2 Materiais e Métodos

4.2.1 Precipitação na Bacia do rio Piracicaba

Os dados de precipitação na Bacia do rio Piracicaba durante o estudo foram fornecidos pelo Departamento de Água e Energia Elétrica de São Paulo e foi recordada mensalmente em três locais de monitoramento existentes no rio Piracicaba nas cidades de Americana, Piracicaba e Artemis.

4.2.2 Caracterização da área de estudo

O rio Piracicaba está localizado na região Sudeste do Brasil (Estado de São Paulo) e é formado à montante da cidade de Americana através da junção dos rios Atibaia e Jaguari e deságua na represa de Barra Bonita próximo à cidade de Santa Maria da Serra percorrendo assim cerca de 250 km. O uso da terra na extensão do seu curso ocorre principalmente através do cultivo de pastagens, citrus e cana-de-açúcar. A região do rio Piracicaba apresenta um crescimento populacional e industrial maior que a média do país, e devido ao acelerado desenvolvimento, tornou-se um pólo de diversas atividades altamente consumidoras e degradadoras dos recursos hídricos, em que o aumento do consumo de água, as cargas de esgotos urbanos e agroindustrial, aliado às mudanças no uso da terra, são as principais causas de alterarem tanto a sua quantidade quanto a qualidade (KRUSH et al., 1997; MARTINELLI et al., 1997).

4.2.3 Período e locais de amostragem

Amostras de água foram coletadas mensalmente ao longo do rio Piracicaba durante os meses de março de 2011 a janeiro de 2012 em seis diferentes locais de amostragem e foram assim determinadas: Ponto 1 (montante de Americana), Ponto 2 (jusante de Americana), Ponto 3 (montante de Piracicaba) Ponto 4 (jusante de Piracicaba), Ponto 5 (município de Artemis), Ponto 6 (montante da Represa de Barra Bonita). A Figura 1 mostra a localização dos locais de amostragem. As amostras foram armazenadas em frascos de vidro ambar escuro e cobertas com plástico preto para evitar a exposição à luz. Logo após a coleta, estas foram levadas ao Laboratório de Ecotoxicologia do Centro de Energia Nuclear na Agricultura/Universidade de São Paulo para análise.

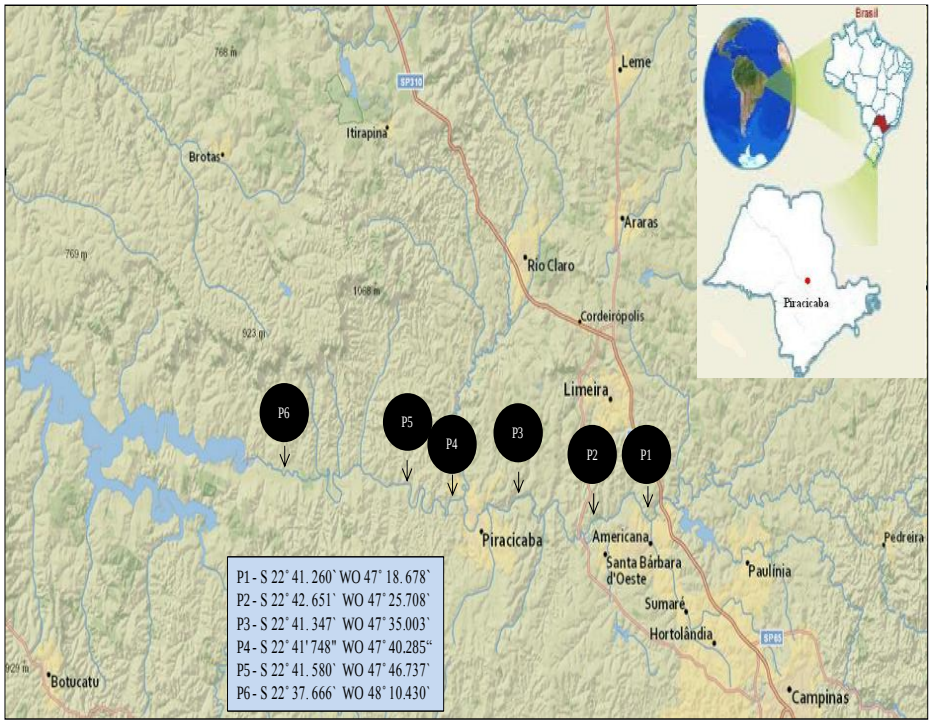

Figura 1 - Localização dos pontos de amostragem no Rio Piracicaba.

4.2.4 Determinação de clorofila *a* e IET

Para avaliar o IET da água do rio Piracicaba foi utilizado o índice desenvolvido por Carlson (1997) e adaptado para águas dos rios do Estado de São Paulo por Lamparelli (2004).

Primeiramente, 200 mL de amostra de água de cada ponto foram filtradas em funil de Büchner contendo filtro de fibra de vidro de porosidade 0,1µm. Em seguida, os filtros foram congelados por 24 horas a uma temperatura de -12 ºC. Após este período, os filtros foram colocados em placas de petri seguido de adição de 10 mL de acetona 90% para que ocorresse a extração dos pigmentos e colocados em geladeira por 24 horas. Após 24 horas, o extrato foi centrifugado por 20 minutos a 3500 rpm. Após a centrifugação, o líquido sobrenadante foi retirado e completado com 10 mL de acetona 90% para posterior leitura em espectrofotômetro (Hach DR5000) nos comprimentos de onda de 663 e 750 nm. A leitura a 663 nm é aquela em que se detecta a absorção de clorofila *a*, enquanto que na de 750 nm a clorofila *a* praticamente não absorve mais luz, mas sim outros pigmentos e materiais em suspensão (TAVARES, 1995). Todos os procedimentos foram realizados com a menor quantidade de luz possível. Para o cálculo da concentração de clorofila *a*, utilizou-se as seguintes fórmulas:

$$\mathrm{Eclor} = \mathrm{E663} - \mathrm{E750}$$

$$\mathrm{Pclor} = \frac{\mathrm{Eclor} \times 1000 \times \mathrm{Vextr\ (mL)}}{\mathrm{Kclor} \times \mathrm{Vfilt\ (L)}}$$

Onde**:** E663 = leitura a 663 nm, E750 = leitura a 663 nm, Eclor = leitura corrigida para clorofila *a*, e Pclor = concentração de clorofila *a* ($\mu g \cdot L^{-1}$), 1000 = correção do volume por litro, Vextr (mL) = volume do extrato (10 mL), Kclor = coeficiente de extinção para clorofila *a* (89) e Vfilt (L) = volume filtrado (em litros).

Posteriormente à determinação da concentração de clorofila *a*, foi determinado o IET através da seguinte fórmula:

$$\mathrm{IET\ (CL)} = 10 \times (6 - ((-0{,}7 - 0{,}6 \times (\ln \mathrm{CL}))/\ln 2)) - 20$$

Onde: CL= concentração de clorofila *a* em $\mu g \cdot L^{-1}$ e ln = logaritmo natural.

Os resultados do IET foram comparados utilizando-se a classificação de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1 - Classificação do IET com a ponderação para clorofila *a* segundo Lamparelli (2004)

Categoria	Ponderação	Clorofila *a* (µg L^{-1})
Ultraoligotrófico	IET ≤ 47	CL≤0,74
Oligotrófico	47<IET≤52	0,74≤CL≤1,31
Mesotrófico	52<IET≤59	1,31≤CL≤2,96
Eutrófico	59<IET≤63	2,96≤CL≤4,70
Supereutrófico	63<IET≤67	4,70≤CL≤7,46
Hipereutrófico	IET>67	7,46<CL

4.3 Resultados e Discussão

Durante o estudo, os meses que apresentaram altos índices pluviométricos foram: março, abril e outubro de 2011 e janeiro de 2012 para Piracicaba; novembro e dezembro de 2011 e janeiro de 2012 para Americana; e outubro de 2011 para Artemis (Figura 2).

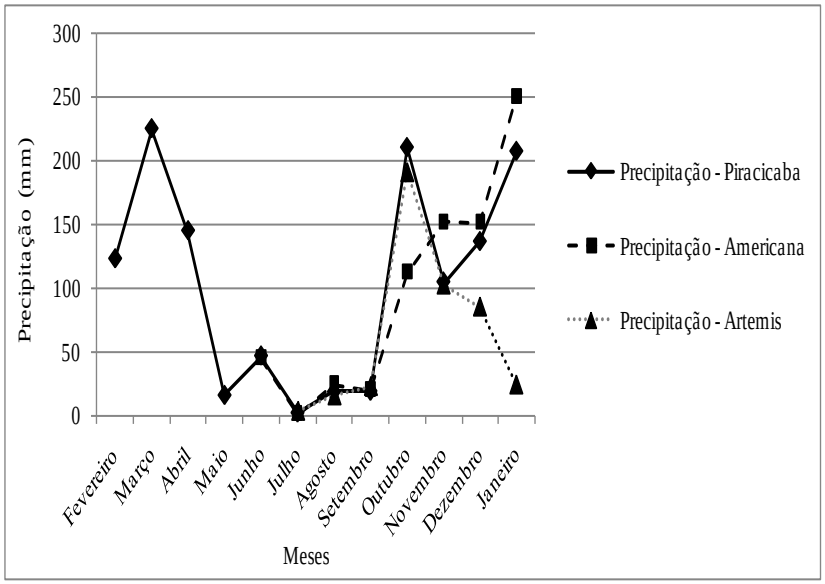

Figura 2 - Pluviosidade (mm) no rio Piracicaba durante o período do estudo

Os valores das concentrações de clorofila *a* encontrados nas amostras durante o período do estudo estão apresentados na Tabela 2.

O Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) por meio da resolução 357 de 2005 dispõe sobre a classificação e diretrizes ambientais para o enquadramento dos corpos de

água superficiais, bem como condições e padrões de lançamento de efluentes. Um dos parâmetros da água que é levado em consideração é a concentração de clorofila *a*. De acordo com o CONAMA, para água doce superficial de classe 1 (abastecimento para consumo humano após tratamento simplificado), classe 2 (abastecimento para consumo humano após tratamento convencional), e classe 3 (abastecimento para consumo humano após tratamento avançado) a concentração máxima de clorofila *a* permitida é de 10, 30, e 60 µg L^{-1}, respectivamente (BRASIL, 2005). No presente trabalho, em nenhuma amostra de água coletada durante o período do estudo observou-se valores de clorofila maiores ou próximos a 10 µg L^{-1} (Tabela 2).

Tabela 2 - Concentração (µg L^{-1}) de clorofila *a* determinada nas amostras de água coletadas em diferentes pontos de amostragens no rio Piracicaba de março de 2011 a janeiro de 2012.

Locais	**Meses**											
	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Jan	**Média**
Ponto 1	0,06	0,16	0,28	0,28	0,06	0,34	0,33	3,14	0,28	0,22	0,05	0,47
Ponto 2	0,06	0,06	0,22	0,06	0,06	0,79	0,39	1,68	0,50	0,34	0,05	0,38
Ponto 3	0,06	0,16	0,16	0,11	0,06	0,17	0,61	1,63	1,46	0,78	0,05	0,47
Ponto 4	0,06	0,06	0,22	0,06	0,06	0,28	0,56	2,86	1,40	0,90	0,05	0,59
Ponto 5	0,06	0,06	0,16	0,11	0,06	0,28	0,89	1,63	1,01	0,28	0,05	0,42
Ponto 6	0,06	0,28	0,06	0,05	0,11	4,1	0,06	0,06	0,22	0,05	0,05	0,46
Média	0,06	0,06	0,18	0,11	0,07	0,99	0,47	1,83	0,81	0,43	0,05	

Durante o período de amostragem, os locais que apresentaram maiores concentrações de clorofila *a* baseado nos valores médios foram os pontos: 4, 1, 3 e 6 seguidos pelos pontos 5 e 2 (Tabela 2). Segundo Ladim de Souza et al. (2009) maiores concentrações de clorofila *a* tendem a ser encontradas em ambientes onde há grande disponibilidade de nutrientes inorgânicos dissolvidos para produção primária oriunda principalmente de efluentes industriais. No caso do presente estudo, de todos os locais de amostragem, aquele que sofre menos a influência direta de efluentes industriais e esgotos sanitários é o ponto 6, no entanto, mesmo assim a disponibilidade de componentes inorgânicos oriundos das indústrias

localizadas entre os pontos 1 e 5 parecem ter contribuido com a disponibilidade de nutrientes neste ponto.

Em relação à variação temporal de clorofila *a* no rio Piracicaba, nota-se que os meses que apresentaram maiores valores foram agosto, setembro, outubro e novembro de 2011. Estes resultados mostram não estar relacionados com a precipitação durante o período de estudo na bacia do rio Piracicaba, já que em meses com maior precipitação como março, abril, dezembro e janeiro, as concentrações de clorofila *a* foram mais baixas se comparados, por exemplo, com outubro onde também houve uma maior precipitação, porém com concentrações elevadas de clorofila *a* (Tabela 2). No entanto, sabe-se que com o aumento da precipitação há maior diluição de nutrientes (fósforo, nitrogênio, etc) no ambiente aquático, e isso pode ter influenciado nas baixas concentrações de clorofila *a* no período chuvoso. A relação entre concentração de clorofila *a* e precipitação não tem apresentado um padrão de acordo com alguns estudos. Por exemplo, Bastos, Feitosa e Muniz (2005) encontraram maiores concentrações de clorofila *a* em período chuvoso, ao contrário de Ladim de Souza et al. (2009) que encontraram valores mais altos em período seco.

Segundo Smayda (1983), a caracterização da variabilidade de clorofila *a* a longo prazo, como no presente estudo, é essencial para detectar efeitos antrópicos sobre a dinâmica do fitoplâncton. Além disso, entender a relação entre nutrientes e clorofila *a* pode ajudar a evitar o processo de eutrofização.

Durante o período de amostragem o IET foi classificado em quatro categorias: ultraoligotrófico, oligotrófico, mesotrófico e eutrófico. Os locais de amostragem que apresentaram maiores valores médios de IET foram os pontos 3 e 4, seguido pelos pontos 1, 5, 2 e 6 (Tabela 3). No entanto, baseado nos valores médios, todos os pontos se enquadraram dentro da classificação ultraoligotrófica (Tabela 4). Estes resultados mostram que apesar de poder estar ocorreendor grandes disponibilidade de nutrientes oriundos das atividades agrícolas e industriais, a produtividade pode estar sendo mascarada pela diluição destas substâncias, já que o rio Piracicaba é extenso e possui um grande volume de água. Além disso, outro fator importante a ser considerado é a presença de contaminantes tais como agrotóxicos, corantes têxteis e metais que podem estar inibindo o crescimento das algas.

Tabela 3 - Índice de Estado Trófico determinado nas amostras de água coletada em diferentes pontos de amostragens no rio Piracicaba de março de 2011 a janeiro de 2012.

Locais	**Meses**											
	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Jan	**Média**
Ponto 1	25,10	34,23	39,10	39,10	25,10	40,70	40,50	60,00	39,10	37,01	25,10	36,82
Ponto 2	25,10	25,10	37,01	25,10	25,10	48,05	41,90	54,60	44,14	40,50	25,10	35,60
Ponto 3	25,10	34,23	34,23	31,00	25,10	34,25	45,80	54,30	53,30	49,20	25,10	37,41
Ponto 4	25,10	25,10	37,01	25,10	25,10	39,10	45,10	59,30	53,00	48,60	25,10	37,05
Ponto 5	25,10	25,10	34,23	31,00	25,10	39,10	48,60	54,30	50,20	39,10	25,10	36,08
Ponto 6	25,10	39,10	25,10	25,10	31,00	62,40	25,10	25,10	37,01	25,10	25,10	31,38
Média	25,10	28,14	34,44	29,40	26,08	43,93	41,16	51,26	46,12	39,91	25,10	

Tabela 4 - Classificação do IET das amostras de água coletadas em diferentes pontos de amostragens no rio Piracicaba de março de 2011 a janeiro de 2012.

	Meses											
Locais	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Jan	**Classificação**
Ponto 1	Ultra	Ultra	Ultra	Ultra	Ultra	Ultra	Ultra	Eutro	Ultra	Ultra	Ultra	Ultra
Ponto 2	Ultra	Ultra	Ultra	Ultra	Ultra	Oligo	Ultra	Meso	Oligo	Ultra	Ultra	Ultra
Ponto 3	Ultra	Ultra	Ultra	Ultra	Ultra	Ultra	Ultra	Meso	Meso	Oligo	Ultra	Ultra
Ponto 4	Ultra	Ultra	Ultra	Ultra	Ultra	Ultra	Ultra	Meso	Meso	Oligo	Ultra	Ultra
Ponto 5	Ultra	Ultra	Ultra	Ultra	Ultra	Ultra	Oligo	Meso	Meso	Ultra	Ultra	Ultra
Ponto 6	Ultra	Ultra	Ultra	Ultra	Ultra	Eutro	Ultra	Ultra	Ultra	Ultra	Ultra	Ultra
Classificação	Ultra	Ultra	Ultra	Ultra	Ultra	Ultra	Ultra	Oligo	Ultra	Ultra	Ultra	

Os dados apresentados sobre a avaliação temporal do IET mostram que a amostra de água coletada no período entre março a julho e dezembro e janeiro apresentaram menores valores médio (Tabela 3), e desta forma, estas foram classificadas como ultraoligotrófica (Tabela 4). Já as amostras coletadas entre os meses de agosto a novembro, apresentaram maiores valores de IET (Tabela 3), no entanto, mesmo assim foram classificadas como ultraoligotrófica, exceto no mês de outubro que se apresentou como oligotrófica (Tabela 4).

Os resultados apresentados de IET para o rio Piracicaba durante o período de estudo também não mostram estar relacionados com a precipitação na bacia, pois em meses como agosto e setembro onde se observou baixas precipitações obtiveram valores altos de IET, enquanto que outubro e novembro apresentaram alta pluviosidade e altos valores de IET.

A Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental (CETESB) do Estado de São Paulo realiza anualmente uma avaliação da qualidade de águas superficiais das principais Bacias Hidrográficas do estado incluindo a Bacia do Rio Piracicaba. Para avaliação do IET, a CETESB leva em consideração tanto clorofila *a* como fósforo total. No último relatório divulgado referente ao ano de 2012, os valores de clorofila *a* variaram de 6,4 a 7,7 µg L^{-1} com media de 6,84 µg L^{-1} (CETESB, 2012), abaixo do limite estabelecido pelo CONAMA, bem como no presente trabalho. Valores de IET variaram de 56 a 60 com valor médio de 58,5 caracterizando assim como mesotrófico.

Os resultados apresentados neste estudo e pela CETESB sugerem que o rio Piracicaba ao longo do tempo pode vir a apresentar eutrofização já que no presente estudo (realizado entre março de 2011 a janeiro de 2012) o mesmo foi caracterizado como ultraoligotrófico e no da CETESB como mesotrófico. No presente trabalho, utilizou-se somente o parâmetro clorofila *a* diferentemente da CETESB, e desta forma os resultados da CETESB podem ter apresentados maiores valores de IET devido à avaliação em conjunto com o fósforo total. No entanto, a relação entre fósforo e clorofila *a* na determinação do IET não tem seguido um padrão. No estudo de Maranho (2011), por exemplo, o IET foi consideravelmente maior baseado na concentração de clorofila *a* comparado quando se utilizou o fósforo total. No entanto, pelo fato da determinação de baixas concentrações de fósforo, quando o IET foi avaliado através dos dois parâmetros, o rio Corumbataí apresentou-se como ultraoligotrófico na maior parte do período e pontos amostrados.

Avaliando a concentração de clorofila *a* no litoral de Santa Catarina (Brasil), Proença (2002) encontrou concentrações variando entre 0,19 e 10,53 µg L^{-1}. Silvério da Silva et al. (2010) observaram valores superiores aos determinados no presente estudo, inclusive maiores que o permitido na legislação brasileira para o Rio São Francisco Falso localizado no estado

do Paraná. Em outro estudo, Souza et al. (2009) encontraram valores próximos de 60 µg L^{-1} para o estuário do Rio Cachoeira (Nordeste do Brasil). De acordo com os autores dos estudos citados anteriormente, altos valores de clorofila *a* se devem à influência de indústrias e a precipitação antes do período de amostragem.

Estudos realizados fora do Brasil também merecem destaques. Thiemann e Kaufmann (2000) encontraram valores variando entre 1 a 90 µg L^{-1} para um lago na Alemanha. Já Yang et al. 2012, encontraram valores ainda maiores, variando entre 17,05 ±1,29 e 264,54 ± 15,37 µg L^{-1}.

Thiemann e Kaufmann (2000) também avaliaram o estado trófico de cinco lagos na Alemanha e encontraram valores de IET variando entre 40 e 75. Em outro estudo, Yang et al., (2012) encontraram IET de 85,29 como o valor mais alto dentre os onze reservatórios estudados. Estes valores foram maiores aos do presente trabalho onde o menor valor encontrado foi de 25,10 e o máximo de 62,40. Em estudo realizado no Brasil, Affonso et al. (2011) encontraram valores extremamente altos para clorofila *a*, e por conta disso amostras de água coletadas no Lago Grande de Curuaí (Pará) onde foi realizado o estudo apresentaram altos valores de IET. Em todos os três trabalhos citados acima foi utilizado o parâmetro clorofila *a* para cálculo do IET, porém estes estudos ocorreram em lagos ou reservatórios, ou seja, ambientes lênticos, diferentemente do presente trabalho que ocorreu em ambiente lótico onde a vazão, a extensão e a diluição podem influenciar na determinação de baixos valores.

4.4 Conclusão

O presente estudo avaliou a distribuição espacial e temporal da clorofila *a* nas águas do rio Piracicaba para posteriormente determinar o IET. No entanto, como apresentado, os resultados mostraram baixas concentrações de clorofila *a* nas amostras de água o que levou a determinação de baixos valores de IET. Porém, considera-se que tanto o volume de água deste rio e à inibição do crescimento de algas por parte de contaminantes presentes neste ambiente podem ter mascarado os resultados, e desta forma, não siginificando que o rio Piracicaba não esteja eutrofizado. Sendo assim, recomendamos que na avaliação de IET para rios que sofrem grandes influencia industrial e agrícola como o rio Piracicaba é importante determinar além da clorofila *a* nas amostras de água, concentrações de fósforo e nitrogênio que são nutrientes associados ao fenômeno de eutrofização. Além disso, a avaliação do IET no rio Piracicaba deve ser periodicamente realizada, já que a região onde o rio está localizado apresenta características que contribuem para este processo. Destaca-se ainda a importância da inclusão

da determinação do IET em estudos de monitoramento de ambientes aquáticos já que esta é uma importante ferramenta na determinação da eutrofização.

Referências

AFFONSO, A.G.; BARBOSA, C.; NOVO, E.M.L.M. Water quality changes in floodplain lakes due to the Amazon River flood pulse: Lago Grande de Curuaí (Pará). **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos**,** v.71, n.3, p.601-610, 2011.

ALVES, I.C.C.; EL-ROBRINI, M.; SANTOS, M.L.S.; MONTEIRO, S.M.; BARBOSA, L.P.F.; GUIMARÃES, J.T.F. Qualidade das águas superficiais e avaliação do estado trófico do Rio Arari (Ilha de arajó, norte do Brasil). **Acta Amazonica**, Manaus, v.42, n.1, p.115 – 124, 2012.

BASTOS, R.B.; FEITOSA, F.A.N.; MUNIZ, K. Variabilidade espaço-temporal da biomassa fitoplanctônica e hidrologia no estuário do Rio Uma (Pernambuco – Brasil). **Tropical Oceanography**, Recife, v.33, n.1, p.1-18, 2005.

BOESCH, D. Challenges and opportunities for science in reducing nutrient over-enrichment of coastal ecosystems. **Estuaries**, Twisp, v.25, n.4, p.744–758, 2002.

CARLSON, R.E. A trophic state index for lakes. **Limnology Oceanography**, Waco, v. 22, n. 2, p. 361–369, 1977.

CLOERN, J.E. Our evolving conceptual model of the coastal eutrophication problem. **Marine Ecology Progress Series**, Oldendorf, v.210, p.223-253, 2001.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Qualidade das águas superficiais no Estado de São Paulo**. São Paulo: CETESB, 2012. 370 p.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução n.357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências**. Brasilia: CONAMA, 2005. 27 p.

DEVLIN, M.; BRICKER, S.; PAINTING, S. Comparison of five methods for assessing impacts of nutrient enrichment using estuarine case studies. **Biogeochemistry**, The Hague, v.106, n.2, p.177-205, 2011.

ELSER, J.J.; BENNETT, E. A broken biogeochemical cycle. **Nature**, London, v.478, n.7367, p.29–31, 2011.

FERREIRA, J. G.; ANDERSEN, J. H.; BORJA, A.; BRICKER, S.; CAMP, J.; CARDOSO DA SILVA, M.; GARCÉS, E.; HEISKKANEN, A.S.; HUMBORG, C.; IGNATIADES, L.; LANCELOT, C.; MENESGUEN, A.; TETT, P.; HOEPFFNER, N.; CLAUSSEN, U. Overview of eutrophication indicators to assess environmental status within the European Marine Strategy Framework Directive. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, London, v.93, n.2, p.117-131, 2011.

GLIBERT, P.M.; ALLEN, J.I.; BOUWMAN, A. F.; BROWN, C. W.; FLYNN, K. J.; LEWITUS, A.J.; MADDEN, C.J. Modeling of HABs and eutrophication: status, advances, challenges. **Journal of Marine Systems**, Amsterdm, v.83, n.3-4, p.262-275, 2010.

GRAHAM, L.E.; GRAHAM, J.M.; WILCOX, L.W. **Algae**. 2nd ed. New York: Benjamin Cumming, 2009.

KRUSCH, A. V.; CARVALHO, F. P.; MORAES, J. M.; CAMARGO, P. B.; BALLESTER, M. V. R.; HORNINK, S.; MARTINELLI, L. A.; VICTORIA, R. L. Spatial and temporal water quality variability in the Piracicaba River Basin, Brazil. **Journal of the American Water Resources Association**, Herndon, v.33, n.5, p.1117–1123, 1997.

LADIM DE SOUSA, M.F.; EÇA, G.F.; SILVA, M.A.M.; AMORIM, F.A.C.; LOBO, I.P. Distribuição de nutrientes dissolvidos e clorofila *a* no estuário do Rio Cachoeira, Nordeste do Brasil. **Atlântica**, Porto Alegre, v.31, n.1, p.107-121, 2009.

LAMPARELLI, M.C. **Grau de trofia em corpos d'água do estado de São Paulo: avaliação dos métodos de monitoramento**. 2005. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 2004.

MARANHO, L.A. **Avaliação da qualidade da água do rio Corumbataí (SP) por meio de variáveis bióticas e abióticas**. 2012. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

MARTINELLI, L.A.; VICTORIA, R.L. Spatial and temporal water quality variability in the Piracicaba River Basin, Brazil. **Journal of the American Water Resources Association**, Herndon, v.33, n.5, p.1117–1123, 1997.

PAERL, H.W. Controlling eutrophication along the freshwater–marine continuum: dual nutrient (N and P) reductions are essential. **Estuaries and Coasts**, v.32, n.4, p.593-601, 2009.

PRIMPAS, I.; KARYDIS, M. Improving statistical distinctness in assessing trophic levels: the development of simulated normal distributions. **Environmental Monitoring and Assessement**, Dordrecht, v.169, n.1-4, p.353-365, 2010.

PROENÇA, L.A.O. Clorofila *a* do fitoplâncton em seis enseadas utilizadas para o cultivo de moluscos bivalves no litoral de Santa Catarina. **Notas Técnicas Facimar**, Itajaí, v.6, n.1, p.33-44, 2002.

RAKOCEVIC-NEDOVIC J.; HOLLERT H. Phytoplankton community and chlorophyll *a* as trophic state indices of Lake Skadar (Montenegro, Balkan). **Environmental Science and Pollution Research**, Dordrecht, v.12, n.3, p.146–152, 2005.

SILVÉRIO DA SILVA, G.; MIOLA, S.; SILVÉRIO DA SILVA, G.; SOUZA, E.R. Avaliação das águas do Rio São Francisco Falso, Tributário do Reservatório de Itaipú, Paraná. **Eclética Química**, Araraquara, v.35, n.3, p.117-122, 2012.

SMAYDA, T. J. **The plankton of estuaries**. In: KETCHUM, B.H. (Ed). Estuaries and enclosed seas. Amsterdam: Elsevier, 1983. p.65-112,

SMITH, V.H.; SCHINDLER, D.W. Eutrophication science: where do we go from here? **Trends in Ecology and Evolution**, Barking, v.24, n.4, p.201–207, 2009.

SOUZA, M.F.L.; EÇA, G.F.; SILVA, M.A.M.; AMORIN, F.A.C.; LÔBO, I.P. Distribuição de nutrientes dissolvidos e clorofila *a* no estuário do Rio Cachoeira, Nordeste do Brasil. **Atlantica**, Rio Grande, v.31, n.1, p.107-121, 2009.

TAVARES, L.H.S.; ROCHA, O. **Produção de plâncton (Fitoplâncton e Zooplâncton) para alimentação de organismos aquáticos**. São Carlos: Rima, 2003. 106 p.

THIEMANN, S.; KAUFMANN, H. Determination of chlorophyll content and trophic state of lakes using field spectrometer and IRS-1C satellite data in the mecklenburg lake district, Germany. **Remote Sensing of Environment**, New York, v.73, n.2, p.227–235, 2000.

ZANINI, H.H.T.; AMARAL, L.A.; ZANINI, J.R.; TAVARES, L.H.S. Caracterização da água da microbacia do Córrego Rico avaliada pelo índice de qualidade de água e de estado trófico. **Engenharia Agrícola**, Jaboticabal, v.30, n.4, p.732-741, 2010.

WETZEL, RG. **Limnology:** lake and river ecosystems. San Diego: Academic Press, 2001. 1006 p.

YANG, J.; YU, X.; LIU, L.; ZHANG, W.; GUO, P. Algae community and trophic state of subtropical reservoirs in southeast Fujian, China. **Environmental Science and Pollution Research**, Dordrecht, v.19, n.5, p.1432–1442, 2012.

YU, H.B.; XI, B.D.; JIANG, J.Y.; HEAPHY, M.J.; WANG, H.L; LI, D.L. Environmental heterogeneity analysis, assessment of trophic state and source identification in Chaohu Lake, China. **Environmental Science and Pollution Research**, Dordrecht, v.18, n.8, p.1333–1342, 2011.

5. CONCENTRAÇÕES DE ATRAZINA E AMETRINA ENCONTRADAS NO RIO PIRACICABA (SÃO PAULO, BRASIL) INDUZEM A FORMAÇÃO DE MICRONÚCLEO E ALTERAÇÕES NUCLEARES ERITROCITÁRIA EM PEIXES

Resumo

Um método rápido utilizando a técnica de Cromatografia Líquida acoplada a Espectrômetro de Massas (LC-MS/MS) por injeção direta de amostra aquosa (DAI) para análise de atrazina e ametrina em águas superficiais foi desenvolvido. Posteriormente, amostras de água foram coletadas mensalmente em seis locais no rio Piracicaba entre fevereiro de 2011 a janeiro de 2012 e injetadas em LC-MS/MS. O método proposto mostrou ser linear apresentando valores de coeficiente de correlação maiores que 0,99 para ambos os herbicidas. Os limites de detecção e quantificação para atrazina e ametrina foram 0,07 e 0,10 µg L^{-1} e 0,09 e 0,14 µg L^{-1}, respectivamente. Os valores médios de recuperação obtidos para o atrazina foi de 92,4% com coeficiente de variação de 2,4% e para o ametrina de 95,2% com coeficiente de variação de 2,9%. As concentrações encontradas de atrazina e ametrina na água do rio Piracicaba variaram de 0,11 a 1,92 µg L^{-1} e de 0,25 a 1,44 µg L^{-1}, respectivamente. Após análise dos herbicidas, foi estabelecida uma faixa de concentrações encontradas na água e expostas ao peixe *Danio rerio* para determinação da formação de micronúcleos (NM) e alterações nucleares eritrocitárias (ANE). As concentrações de atrazina e ametrina encontradas na água do rio Piracicaba mostraram ter potencial genotóxico e mutagênico para *D. rerio*.

Palavra-chave: Atrazina. Ametrina. Genotoxidade. Injeção aquosa direta. LC-MS/MS. Mutagenicidade.

Abstract

A rapid method using Liquid Chromatography Coupled to Mass Spectrometry Triple Quadrupole (LC-MS/MS) direct aqueous injection (DAI) for analysis of atrazine and ametrine in waters was developed. Following the method validation sampling water at six locations in the Piracicaba River were collected monthly from February 2011 to January 2012 and injected into LC-MS/MS without the need of sample extraction. The method showed to be linear presenting values of coefficient of correlation greater than 0.99 for both herbicides. The limits of detection and quantification for atrazine and ametrine were 0.07 and 0.10 µg L^{-1} and 0.09 and 0.14 µg L^{-1}, respectively. The average recovery values obtained for atrazine was 92.4% with coefficient of variation of 2.4%. For ametrine, the average recovery was 95.2 % with coefficient of variation of 2.9%. Concentrations of atrazine and ametrine during the sampling period ranged from 0.11 to 1.92 µg L^{-1} and from 0.25 to 1.44 µg L^{-1}, respectively. After analysis of the herbicides in the water the fish *Danio rerio* was exposed to a range of concentrations found in the river to analyze the induction of micronuclei (NM) and nuclear abnormalities in erythrocyte (ANE). Concentrations of atrazine and ametrine found in the Piracicaba River have shown genotoxic and mutagenic potentials to *D. rerio*.

Keywords: Atrazine. Ametrine. Direct aqueous injection. Genotoxicity. LC-MS/MS. Mutagenicity.

5.1 Introdução

Um dos mais relevantes problemas relacionados aos recursos hídricos tem sido a presença de uma enorme variedade de poluentes orgânicos nas águas superficiais. Muitas dessas substâncias, incluindo os herbicidas triazínicos são tóxicos e perigosos para os sistemas aquáticos e seres humanos. As triazinas são usadas mundialmente na pré e pós-emergência para o controle de gramínias e plantas daninhas em muitas culturas agrícolas (DOS SANTOS et al., 2006). Como resultado de sua alta mobilidade no ambiente água-solo, as triazinas podem ser encontradas em águas subterrâneas e superficiais (HILDEBRANDT et al., 2008; PALMA et al., 2009).

A Cana-de-açúcar é uma das maiores monoculturas do Brasil (BOTELHO et al., 2012) e o controle de plantas daninhas tem sido muitas vezes realizado através da aplicação de herbicidas tais como o atrazina e ametrina. Ambos, atrazina (1-Chloro-3-ethylamino-5-isopropylamino-2,4,6-triazine) e ametrina (N^2-ethyl-N^4-isopropyl-6-methylthio-1,3,5-triazine-2,4-diamine) são herbicidas utilizados devido a capacidade destes compostos orgânicos em inibir a fotossíntese.

Os rios são os recursos de água doce mais importante no mundo, e, no entanto, estes têm sido poluídos não somente por herbicidas, mas também por outros contaminantes. Por exemplo, no Brasil, resíduos de atrazina e ametrina foram detectados em alguns rios em concentração ambientalmente preocupantes (LAABS et al., 2002; HUANG et al., 2008; JACOMINI et al., 2009; BENVENUTO et al., 2010). Armas et al. (2007), encontraram no rio Corumbataí (afluente do rio Piracicaba) não somente os herbicidas atrazina e ametrina, mas também glifosato, simazina, hexazinona e clomazona.

No estado de São Paulo, a região da cidade de Piracicaba se destaca por ser uma das maiores produtoras de cana-de-açúcar do estado fazendo com que haja uma possibilidade real de contaminação de herbicidas como o atrazina e ametrina em rios da região. O rio Piracicaba, um dos mais importantes, merece destaque, já que as plantações de cana-de-açúcar encontram-se próximos à sua margem, e na maioria das vezes não há a proteção por matas ciliares, o que facilita a contaminação por escoamento superficial. Neste sentido, o monitoramento de resíduos de produtos aplicados nesta cultura e a determinação das concentrações e seus efeitos do ponto de vista ambiental é extremamente importante para saber se os herbicidas que inicialmente foram aplicadas nas plantações estão contaminando os recursos hídricos.

As técnicas cromatográficas têm sido muito utilizadas na determinação de resíduos de pesticidas em diversas matrizes ambientais, como a água. No entanto, na maioria dos estudos em recursos hídricos somente são determinadas a concentração das moléculas. (LENTZA-RISOS, 1996; BALINOVA; MONDESKY, 1999; LI et al., 2006; NAGARAJU et al., 2007; GARCÍA-GALÁN et al., 2010). Além desta confirmação, avaliar se as concentrações presentes no ambiente são tóxicas a organismos aquáticos é de extrema importância devido à interação que há entre xenobióticos e organismos.

Os peixes são o grupo de animais vertebrados mais adequados para estimar a possibilidade de risco no ambiente aquático devido à sua capacidade em metabolizar e acumular poluentes químicos, responder a baixas concentrações de agentes mutagênicos (CAVAS; ERGENE-GOZUKARA, 2005) e ainda por desempenhar diversos papéis na cadeia trófica. Dentre os inúmeros organismos que são atualmente utilizadas em ensaios de toxicidade, a espécie *Danio rerio* tem se destacado pela fácil adaptação às condições laboratoriais, facilidade de manutenção, disponibilidade e baixo custo. *D. rerio*, popularmente conhecido como peixe zebra ou paulistinha, pertence à família Cyprinidae, e é originário da Ásia (WESTERFIELD, 2000). Esta espécie passou a ser adotada como organismo modelo nos campos da biomedicina, ecotoxicologia e genética na última década (BOPP; LETTIERI, 2007), principalmente após o sequenciamento completo do seu genoma (BOPP et al., 2006; SCHIRMER, 2006; RAMSDORF, 2011).

Na avaliação da toxicidade, dentre os sistemas teste disponíveis para avaliar os efeitos tóxicos de agentes químicos, o teste do micronucleo (MN) merece destaque pelo seu baixo custo, reprodutibilidade e rapidez nas análises (AL-SABTI; METCALFE, 1995; CAVAS; ERGENE-GOZUKARA, 2003). MNs são formados durante a divisão celular, e refletem os efeitos citogenéticos, isto é, perda de fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros que não foram incluídos no núcleo principal durante a divisão celular (SCHMID, 1976; AL-SABTI; METCALFE, 1995). Embora o MN possa se originar espontaneamente, a sua indução é comumente usada para se detectar danos mutagênicos, resultantes de exposição a um agente tóxico (HEDDLE et al., 1983). Devido aos eritrócitos de teleosteos serem nucleados, os MNs tem sido utilizado como uma ferramenta eficaz e capaz de mensurar atividade clatrogênica (AL-SABTI; METCALFE, 1995).

Além do teste do MN, alguns autores têm utilizado anormalidades nucleares eritrocitárias (ANE) para avaliar o efeito da exposição a poluentes. A formação de ANE foi descrita em 1990 por Carrasco e colaboradores (CARRASCO et al., 1990), e tem sido relatada em eritrócitos de peixes como consequência da exposição a contaminantes ambientais com

atividade genotóxica e foram basicamente classificadas em *notched*, *blebbed* e *lobed* (AYLLÓN; GARCIA-VASQUEZ, 2000; SOUZA; FONTANETTI, 2006). Embora os mecanismos responsáveis para a formação das ANE não terem sido totalmente explicadas (PACHECO; SANTOS, 1996; AYLLÓN; GARCIA-VAZQUEZ, 2001), estas são consideradas indicadores de danos genotóxicos já que são passíveis de correção, e podem complementar o teste do micronúcleo.

Diversos trabalhos têm sido realizados utilizando o teste do MN e ANE na investigação das propriedades mutagênicas e genotóxicas tanto de agentes químicos como de amostras ambientais em peixes (CAVAS; ERGENE-GOZUKARA, 2005; GUILHERME et al., 2008; STRUNJAK-PEROVIC et al., 2009; MONTEIRO et al., 2011; MURANLI; GUNER, 2011; CAVAS, 2011; NWANI et al., 2011; KAN et al., 2012), mostrando desta forma, que estes parâmetros têm sido eficientes na investigação da genotoxidade e da mutagenicidade ambiental.

O presente trabalho tem como objetivo desenvolver um método cromatográfico rápido de análise de atrazina e ametrina em águas e investigar a indução de MN e ANE no peixe *D. rerio* após exposição à concentrações desses dois herbicidas determinados no rio Piracicaba através da injeção aquosa direta por LC-MS/MS.

5.2 Materiais e Métodos

5.2.1 Localização e período de amostragem

Amostras de água foram coletadas mensalmente ao longo do rio Piracicaba entre fevereiro de 2011 a janeiro de 2012 em seis locais de amostragens (Figura 1) (pontos 1 e 2: montante e jusante da cidade de Americana; pontos 3 e 4: montante e jusante da cidade de Piracicaba; ponto 5: Artemis; ponto 6: montante do Reservatório de Barra Bonita).

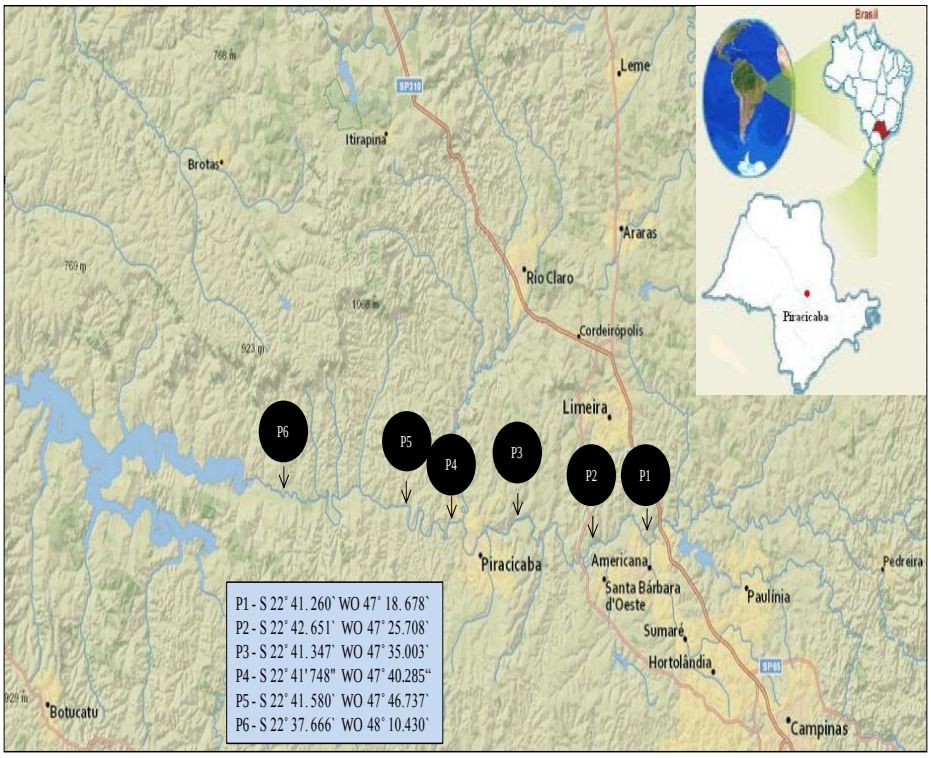

Figura 1 - Localização dos pontos de amostragem no Rio Piracicaba

5.2.2 Solventes e reagentes químicos

Os padrões analíticos de atrazina (98,5% de pureza) e ametrina (99,0% de pureza) foram adquiridos da Chem Service. Acetonitrila HPLC (Tedia Inc) com 99% de pureza foi utilizado para a preparação das soluções padrões dos herbicidas. Para a preparação da fase móvel foram usados ácido fórmico (Tédia) e formiato de amônio (Vetec) com 88,0 e 98,5% de pureza, respectivamente.

5.2.3 Preparo da amostra e condições cromatográficas

Amostras de água (20 mL) foram filtradas em filtro de seringa com membranas de acetato de celulose (0,45 µm) e posteriormente transferidas para *vials* e injetadas diretamente em LC-MS/MS.

As análises foram realizadas utilizando um Cromatógrafo Líquido Acoplado a Espectrômetro de Massas Triplo Quadrupolo (LC-MS/MS) da Agilent Technologies serie 1200 equipado com uma bomba binária e amostrador automático G1367C. As separações cromatográficas foram realizadas utilizando coluna com C18 Zorbax (100 mm x 3,0 mm, 3,5

μm) da Agilent Technologies. O fluxo de 0,6 mL min^{-1} foi mantido em modo isocrático utilizando fase móvel A – Água MilliQ com 0,1% de ácido fórmico e 5 mmol de formiato de amônio e B – acetonitrila (40 +60), volume de injeção de 10 μL e tempo de corrida de 3 minutos.

5.2.4 Otimização do espectrômetro de massas

Para aquisição dos dados, foi utilizado o software Mass Hunter da Agilent Technologies B 02.00 (B1 59.0). Para a detecção, utilizou-se o modo MRM (Monitoração de Reações Múltiplas) através da ionização por electrospray em modo positivo. As transições monitoradas do atrazina e ametrina foram 261,0/103,9 – 216,0/173,0 e 228,1/185,9 – 228,1/95,0, respectivamente.

5.2.5 Validação do método cromatográfico

Todos os procedimentos para validação do método cromatográfico foi baseado na EUROPEAN COMMISSION (2009) e foram verificados os seguintes parâmetros: linearidade, limite de quantificação, limite de detecção, precisão, exatidão e estabilidade dos analitos.

A linearidade foi determinada através de uma curva analítica com sete concentrações de mistura de atrazina e ametrina preparadas na matriz fortificada, injetadas em triplicatas e foram assim estabelecidas: 0,10; 0,25; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0 e 10,0 μg L^{-1}. O coeficiente angular, linear e de correlação foi determinado utilizando programa Excel.

O limite de detecção foi determinado através das médias das amostras em branco (sete réplicas) mais três vezes o desvio padrão das amostras em branco. Já o limite de quantificação, foi determinado a partir das medias dos valores das amostras em branco (sete réplicas) mais dez vezes o desvio padrão das amostras em branco.

A eficiência do método foi investigada através de estudo de recuperação utilizando amostras de água superficial com o conhecimento prévio da ausência dos herbicidas estudados. As amostras foram fortificadas usando três níveis de fortificação (0,3; 0,6 e 3,0 μg L^{-1}) com sete réplicas em cada nível. A precisão foi expressa pelo desvio padrão e coeficiente de variação das recuperações e foram considerados como faixa aceitável valores

menores que 30% (USEPA, 1999). Para a recuperação, foram considerados aceitáveis valores entre 70 e 120%, o que indica a exatidão do método.

Para avaliar a estabilidade dos analitos nos extratos, as amostras fortificadas foram mantidas em refrigerador durante o período de 10, 23 e 38 dias e reanalisadas. Neste experimento, as soluções-padrão foram preparadas imediatamente antes das análises. Para verificar a estabilidade utilizou-se o teste t de Student verificando-se a diferença das médias das recuperações nos intervalos estudados.

5.2.6 Teste do micronúcleo e alterações nucleares eritrocitárias

A partir das concentrações dos herbicidas atrazina e ametrina determinadas por LC/MS-MS em amostras de água coletada no rio Piracicaba durante fevereiro de 2011 a janeiro de 2012, cinco concentrações foram estabelecidas para exposição a *Danio rerio* que foram: 0,1; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 µg L^{-1}, mais o controle (água de abastecimento desclorada). Adultos de *D. rerio* (massa corporal de 0,20 a 0,50 g e comprimento de 2 a 3 cm) foram adquiridos durante todo o estudo de um mesmo fornecedor comercial localizado na cidade de Piracicaba (São Paulo, Brasil). Antes do início do teste, os indivíduos foram mantidos em tanques com 60 litros de água de abastecimento desclorada apresentando oxigênio dissolvido maior que 5,0 mg L^{-1}, pH de 6,8 a 7,2 e dureza de 60 a 120 mg L^{-1} de $CaCO_3$ com aeração por um período de cinco dias de aclimatação. Durante este período, os organismos foram alimentados duas vezes ao dia com ração para peixe (Tetramin).

A exposição foi conduzida em béqueres de 2 litros e seguiu-se a metodologia de teste de toxicidade aguda para peixes da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD, 1992). Duas réplicas foram utilizadas para cada concentração mais o grupo controle (água de manutenção) com sete organismos em cada. O teste foi conduzido em sala com temperatura controlada em 25º C. As concentrações dos herbicidas foram preparadas por diluição do padrão analítico de atrazina (98,9% de pureza) e ametrina (99% de pureza) na mesma água utilizada para manutenção dos organismos. O período de exposição foi de 96 horas sob sistema estático (sem alimentação e renovação das soluções testes) com aeração contínua.

Após a exposição, cinco animais de cada repetição foram anestesiados em gelo e tiveram a cauda seccionada para coleta de sangue. Após a realização do esfregaço do sangue em lâminas microscópicas, o material foi fixado em metanol por 10 minutos e corados com Giemsa 5% pelo mesmo período. Posteriormente, foi realizada a lavagem das lâminas em

água corrente. Para a contagem de MN e ANE, 1000 eritrócitos foram analisados em microscópio de luz (1000X). A frequência, média e desvio padrão para MN, núcleo *notched* (NT), *blebbed* (BL), *lobed* (LB), cariólise (C), núcleo vacuolizado (NV), e condensação do material nuclear (CMN) foram calculados para cada peixe e comparados através do teste estatístico de Mann Whitney com $p< 0,01$ e 0,05 entre os tratamentos e controle. No entanto, as alterações C, NV e CMN quando apareceram foram agrupadas em uma única classificação: a morte celular. A frequência de MN e ANE foram calculadas através da seguinte equação:

$$\text{MN/ANE (\%)} = \frac{\textit{Número de eritrócitos contendo MN e ANE}}{\textit{Número total de eritrócitos contados}} \text{ X } 100$$

5.3 Resultados e Discussão

5.3.1 Validação do método cromatográfico e determinação dos herbicidas atrazina e ametrina na água do rio Piracicaba

Os valores de coeficiente angular, linear e de correlação para os produtos analisados estão apresentados na Tabela 1. O método proposto apresentou excelente relação linear com o sinal analítico, indicado pelos valores de coeficiente de correlação maiores que 0,99 para ambos os herbicidas, e apresentou boa sensibilidade em razão dos altos valores do coeficiente angular (Tabela 1).

Tabela 1 - Valores de coeficiente angular, linear e de correlação para atrazina e ametrina

Produto	**Coeficiente angular**	**Coeficiente linear**	**r^2**
Atrazina	1475,33	1,31	0,9994
Ametrina	1852,08	- 23,59	0,9993

Os dois íons precursores mais abundantes e seus fragmentos foram selecionados pelo modo MRM correspondente à otimização dos parâmetros do espectrômetro de massas e seu potencial de fragmentação e colisão, assim como o tempo de retenção de cada molécula (Tabela 2).

Tabela 2 - Tempo de retenção dos compostos (t_r), íon precursor (ip) e íon de quantificação (iq), íon produto (iprod), energia de fragmentação, e energia de colisão das transições 1 e 2.

Herbicida	**t_r (min)**	**Quantificação ip/ iq (1)**	**Confirmação ip/ iprod (2)**	**E.frag (V)**	**Energia Colisão 1 (V)**	**Energia Colisão 2 (V)**
Atrazina	1,62	216/173,9	216/103,9	120	12	28
Ametrina	1,87	228,1/185,9	228,1/95,9	110	16	24

Em estudos de resíduos utilizando técnicas cromatográficas, geralmente é necessário pré concentrar as amostras antes da injeção para se conseguir baixos valores de limite de detecção e quantificação. No presente estudo, não houve necessidade de se concentrar as amostras de água já que o equipamento utilizado apresentou alta sensibilidade para os herbicidas estudados, podendo ser confirmado pelos baixos limites de detecção e quantificação apresentados na Tabela 3. Os valores de recuperação, desvio padrão e coeficiente de variação para cada nível de fortificação dos herbicidas obtidos durante a validação do método, também encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3 - Limite de detecção (LD) (µg L^{-1}), limite de quantificação (LQ) (µg L^{-1}), níveis de fortificação (µg L^{-1}), médias de recuperação (%), desvio padrão (DP) (%) e coeficiente de variação (CV) (%) para atrazina e ametrina.

Produto	**LD**	**LQ**	**Níveis de Foritificação**	**Recuperação**	**DP**	**CV**
Atrazina	0,07	0,10	0,3	104,0	±2,1	2,0
			0,6	90,5	±2,8	3,1
			3,0	82,9	±1,2	1,4
			Média	92,46	±2,03	2,16
Ametrina	0,09	0,14	0,3	106,6	±2,2	2,0
			0,6	94,0	±4,2	4,5
			3,0	85,1	±1,9	2,2
			Média	95,23	±2,76	2,9

Huang et al. (2008) também analisaram resíduos de vários herbicidas dentre eles o atrazina e ametrina em vários tipos de água (superficial, subterrânea e potável) pela técnica LC-MS/MS através da injeção direta de amostras. Os parâmetros operacionais empregados pelos autores foram: modo de ionização +, íon precursor e íon produto para o atrazina de 216,1 – 174,2, respectivamente e para ametrina foi de 228,2 – 186,1, o que proporcionou um tempo de retenção de 2,60 e 2,28 minutos para atrazina e ametrina. No presente estudo, foi utilizado modo de ionização positivo, com íon precursor e produto de íon de 216,0 – 173,9 e 228,0 – 185,9 para atrazina e ametrina, respectivamente, com tempo de retenção de 1,8 e 1,6 minutos (Tabela 2).

Ainda em relação ao estudo de Huang et al. (2008), o método empregado obteve limite de quantificação de 0,05 µg L^{-1} para os dois herbicidas, valores menores que os apresentados no presente estudo para atrazina (0,10 µg L^{-1}) e ametrina (0,14 µg L^{-1}). No entanto deve-se levar em consideração que no presente estudo, foi obtido média de desvio padrão de 2,03 e 2,76 % para atrazina e ametrina respectivamente, comparado a 6,1 e 5,5 % dos autores. É importante ressaltar também que no presente estudo foi utilizado o volume de injeção de 10 µL enquanto que no trabalho de Huang et al. (2008) foi de 50 µL.

Tanabe et al. (2004) utilizaram a técnica LC-MS/MS para analisar atrazina em água através de dois tipos de extração em fase sólida e determinaram o limite de detecção em 1,6 µg L^{-1}. Em outras palavras, esse valor foi quase 23 vezes maior que o obtido no presente estudo. Nesse mesmo trabalho, o método empregado pelos autores apresentou tempo de retenção de 13,3 minutos enquanto no presente trabalho o tempo de retenção para atrazina foi de 1,8 minutos. É importante considerar que quanto menor é o tempo de retenção, maior é a economia de solventes, reagentes e tempo de análise da amostra.

Jacomini et al. (2009) analisaram resíduos de ametrina em água superficial do Rio Mogi-Guaçu e Rio Pardo, Estado de São Paulo, através da técnica LC-MS/MS e obtiveram limite de quantificação em 0,02 µg L^{-1}, valor menor comparado ao encontrado no presente trabalho. No entanto, apesar do método utilizado pelos autores (extração líquido-líquido) apresentar linearidade, o mesmo mostrou não ser exato já que a média de recuperação para cinco níveis de fortificação foi de 51,2% com coeficiente de variação de 6,9%. Já no presente estudo, as médias de recuperação para este herbicida foi de 95,23% (±2.76) com coeficiente de variação de apenas 2,9%, mostrando a precisão do método de acordo com a USEPA (1999).

A estabilidade dos analitos no extrato (Tabela 4) comprovou que os agrotóxicos se mantiveram estáveis até 23 dias armazenado em geladeira, comprovado estatisticamente pelo

"teste t", aplicado para a diferença das médias das recuperações nos intervalos estudados. Estes resultados são extremamente importantes na análise de resíduos de atrazina e ametrina em água, pois significa que após a coleta, a amostra deve ser analisada em até 23 dias.

Tabela 4 – Resultado do teste de estabilidade dos herbicidas atrazina e ametrina

Produto	**Valor de t**		
	10 dias	**23 dias**	**38 dias**
Ametrina	0,367	1,185	2,262
Atrazina	0,379	1,522	6,345

t de referência = 2,018, n1 e n2 = 21; α= 0,05; p= 95%.

A escolha da utilização da técnica LC-MS/MS no presente estudo foi devido à maior sensibilidade por compostos pertencentes à classe das triazinas como relataram Alder et al. (2006). Neste trabalho, os autores apresentaram uma revisão sobre análises de 500 pesticidas de diferentes classes com o objetivo de estabelecer a técnica mais sensível comparando-se Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de massas (CG/MS) com LC-MS/MS. Dentre os 500 pesticidas analisados, 47 não foram detectados por LC/MS-MS contra 135 por CG/MS. Dentre os 23 produtos da classe das triazinas estudadas, todos foram detectados por LC/MS-MS e 6 não foram detectados por CG/MS-MS. Ainda de acordo com os autores, menores limites de quantificação foram obtidos utilizando-se a técnica LC/MS-MS.

As concentrações dos herbicidas atrazina e ametrina encontradas na água do rio Piracicaba durante o período de estudo estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Resultados das análises dos herbicidas atrazina (At) e ametrina (Am) em amostras de água coletadas no rio Piracicaba durante os meses de fevereiro de 2011 a janeiro de 2012

Ponto	Meses																							
	Fev		Mar		Abr		Mai		Jun		Jul		Ago		Set		Out		Nov		Dez		Jan	
	At	Am	At	Am	At	Am	At	Am	At	Am	At	Am	At	Am	At	Am	At	Am	At	Am	At	Am	At	Am
1	-	0,27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,19	0,16
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	0,11	1,44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,14	-
4	-	-	-	-	1,92	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,15	-
5	-	-	-	-	0,83	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	0,22	-	-	-	-	-	-	0,25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,17	-

Obs. Valores abaixo do limite de quantificação do método foram apresentados como -.

As concentrações do herbicida atrazina variaram de 0,11 a 1,92 µg L^{-1} e da ametrina variaram de 0,16 a 1,44 µg L^{-1}. A legislação ambiental brasileira representada pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) por meio da Resolução 357 de 2005 estabelece valores máximos permissíveis para uma enorme variedade de agentes químicos em ambientes aquáticos. Um desses compostos é a atrazina, e segundo a legislação, em ambientes aquáticos brasileiros o limite máximo permitido (LMP) é de 2 µg L^{-1}(BRASIL, 2005). Observa-se que no presente estudo durante todo o período de amostragem, as concentrações para este herbicida estiveram abaixo deste valor. Para ametrina, a legislação ambiental brasileira ainda não possui LMP em água.

Armas et al. (2007) analisaram resíduos de vários herbicidas em amostras de água coletada no rio Corumbataí (afluente do rio Piracicaba) e a faixa de concentrações encontradas para atrazina e ametrina foram de 0,6 a 2,7 µg L^{-1} e 0,7 a 2,9 µg L^{-1}, respectivamente.

Os herbicidas classificados dentro do grupo das triazinas, principalmente o atrazina tem sido os mais presentes em amostras de água superficial e subterrânea ao longo das últimas décadas (YOKLEY; CHEUNG, 2000; HUANG et al., 2006). Diversos métodos cromatográficos têm sido relatados utilizando uma ampla variedade de procedimentos de preparação da amostra, o que demonstra a preocupação por parte de pesquisadores em relação à contaminação dos recursos hídricos por estas moléculas. É importante ressaltar que pelo fato da maioria dos herbicidas desta classe possuírem de moderada a alta solubilidade em água e menor tendência de adsorção ao solo, como é o caso da ametrina (ARMAS et al., 2007), a contaminação dos ambientes aquáticos se torna ainda mais preocupante.

5.3.2 Micronúcleo e alterações nucleares em eritrócitos de peixes

As concentrações dos herbicidas atrazina e ametrina encontradas na água do rio Piracicaba induziram as seguintes alterações nos eritrócitos do peixe *D. rerio*: núcleo *notched*, *lobed*, *blebbed*, condençação do material nuclear, cariólise, vacuolização e micronúcleo (Figura 3).

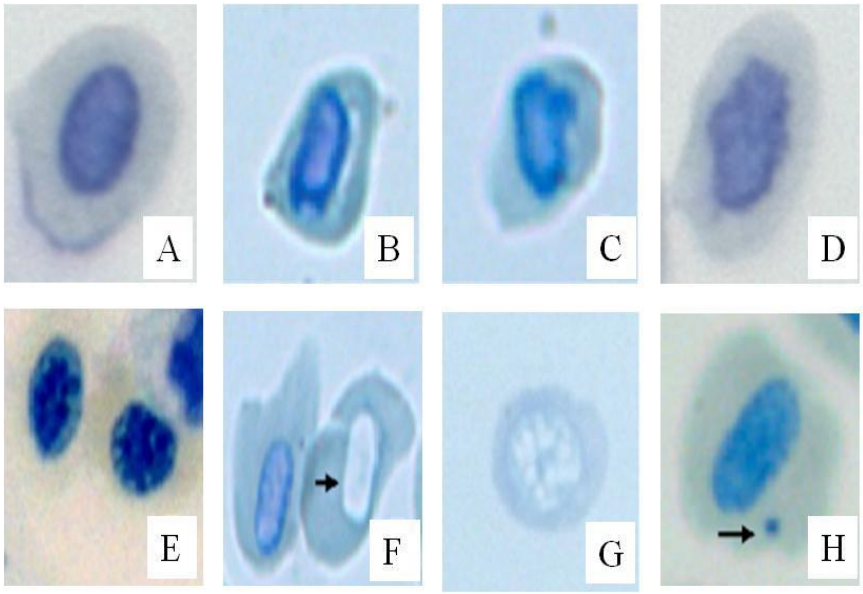

Figura 3 - Alterações nucleares eritrociárias e micronúcleo observados em eritrócitos de *D. rerio* após exposição a concentrações de atrazina e ametrina encontradas no rio Piracicaba durante fevereiro de 2011 a janeiro de 2012. Observar eritrócito normal (A), núcleo *notched* (B), *lobed* (C), *blebbed* (D), condensação do material nuclear (E), cariólise (F), vacuolização (G) e micronúcleo (H).

Já a frequência média e desvio padrão de MN e ANE induzido por concentrações de atrazina e ametrina estão apresentados nas Tabelas 6 e 7, respectivamente.

Tabela 6 – Frequência média e desvio padrão de micronúcleos (MN) e anormalidades nucleares eritrocitárias (ANE) observados em eritrócitos de *D. rerio* expostos a concentrações do herbicida atrazina encontradas na água do rio Piracicaba após exposição aguda (96h)

Tratamento	**MN**	***Notched***	***Blebbed***	***Lobed***	**Morte celular**
CN	0,2 ±0,44	1,2 ±1,09	1,8 ±0,44	1,0 ±0,7	0
0,1 µg·L^{-1}	0	2,0±2,0	2,2 ±1,3	0,8 ±1,3	5,0 ±5,71
0,5 µg·L^{-1}	0,75 ±0,95	5 ±4,83*	9 ±7,39	1,75 ±1,25	1,5 ±3,0
1,0 µg·L^{-1}	1,6 ±1,14*	1,6 ±1,14	2,8 ±1,3	0,6 ±0,89	1,8 ±1,78
1,5 µg·L^{-1}	1,2 ±0,44*	1,2 ±1,09	3,8 ±3,03	1,0 ±1,0	0,8 ±1,3
2,0 µg·L^{-1}	1,6 ±0,54*	1,6 ±1,14	3,4 ±1,14*	0	0

MN: micronúcleo; **CN:** controle negativo.

*Valores estatisticamente significativos pelo método de Mann-Whitney, com $p<0,05$.

Tabela 7 – Frequência média e desvio padrão de micronúcleos (MN) e anormalidades nucleares eritrocitárias (ANE) observados em eritrócitos de *D. rerio* expostos a concentrações do herbicida ametrina encontradas na água do rio Piracicaba após exposição aguda (96h)

Tratamento	**MN**	***Notched***	***Blebbed***	***Lobed***	**Morte celular**
CN	0,4 ±0,54	2,6 ±1,81	3,6 ±3,2	0,2 ±0,44	0,2 ±0,44
0,1 µg·L^{-1}	0	2,8 ±2,77	2,0 ±2,44	0,2 ±0,44	0,2 ±0,44
0,5 µg·L^{-1}	0	3,2 ±1,78	4,2 ±2,48	0,2 ±0,44	66,8 ±60,56*[1]
1,0 µg·L^{-1}	0,6 ±0,54	7,8 ±3,96*	8,6 ±2,3*	0	28,4 ±17,21*[1]
1,5 µg·L^{-1}	1,4 ±0,54*	13,4 ±5,17*	12,6 ±3,97*[1]	0	39,8 ±13,95*[1]
2,0 µg·L^{-1}	1,8 ±0,44*	14,8 ±6,01*[1]	8,6 ±2,3*	0	26,4 ±9,07*[1]

MN: micronúcleo; **CN:** controle negativo.

*Valores estatisticamente significativos pelo método de Mann-Whitney, com $p<0,05$

[1]Valores estatisticamente significativos pelo método de Mann-Whitney, com $p<0,01$

Genotoxicidade é todo efeito causado na molécula de DNA passível de correção, sendo assim, neste estudo considerou-se o aparecimento de núcleo *notched*, *blebbed* e *lobed* como efeito genotóxico, já que, estes danos podem ser reparados. Ao contrário da genotoxicidade, a mutagenicidade não pode ser mais corrigida, e como os MNs não são passíveis de correção, esta alteração foi classificada como efeito mutagênico.

Como observado na Tabela 6, não houve formação de MN quando *D. rerio* foi exposto à menor concentração do herbicida atrazina. Apesar da concentração 0,5 µg L^{-1} ter induzido a formação de MN, esta não se diferiu ($p<0,05$) do grupo controle diferentemente das três maiores concentrações. Sendo assim, através destes resultados pode-se concluir que a atrazina é mutagênica para esta espécie a partir de 1,0 µg L^{-1}.

As ANE mais frequentes após a exposição ao herbicida atrazina foram *blebbed*, *notched*, seguido por *lobed* e morte celular. Não foi observada diferença significativa na frequência média para núcleo *notched* (exceto 0,5 µg L^{-1}), *lobed* e morte celular. Com relação ao núcleo *blebbed*, somente a frequência média da maior concentração diferiu-se do grupo controle ($p<0,05$) (Tabela 6).

Em relação ao herbicida ametrina, não foi observada formação de MN nas duas menores concentrações. Já a concentração 1,0 µg L^{-1} induziu a formação de MN embora não tenha sido significativa ($P<0,05$), diferentemente para as duas maiores concentrações (1,5 e 2,0 µg L^{-1}) (Tabela 7). Através destes resultados observou-se que diferentemente da atrazina, a ametrina possui potencial mutagênico para esta espécie a partir de 1,5 µg L^{-1}.

As ANE mais frequentes após exposição ao herbicida ametrina foram *notched*, *blebbed*, seguido por morte celular e *lobed* (Tabela 7). Os valores médios de núcleo *notched* e *blebbed* diferiram significativamente do grupo controle quando *D. rerio* foi exposto às três maiores concentrações de ametrina (Tabela 7), diferentemente para núcleo *lobed* onde as três maiores concentrações não induziram a formação de ANE, e embora as duas menores concentrações tenham induzido, estas não foram significativas. Mesmos resultados foram encontrados para as concentrações de 0,1 e 0,5 µg L^{-1} para *notched* e *blebbed*. Já em relação à morte celular, somente a menor concentração (0,1 µg L^{-1}) não se diferiu do grupo controle ($P<0,05$).

A presença de herbicidas em ambientes aquáticos é uma questão importante que precisa ser constantemente considerada, especialmente quando o recurso hídrico situa-se próximo a áreas agrícolas, como é o caso do rio Piracicaba.

As concentrações dos herbicidas atrazina e ametrina mensuradas no rio Piracicaba não promoveram toxicidade aguda para o peixe *D. rerio*, já que após o período de exposição não

foi evidenciado mortalidade tanto nos grupos tratados com herbicidas como no controle. No entanto, tais agroquímicos revelaram potencial genotóxico e mutagênico frente aos parâmetros avaliados.

Na avaliação da genotoxicidade, muitos autores consideram diferentes alterações que podem ser observadas nos núcleos dos eritrócitos de peixes, embora o mecanismo de formação dessas anormalidades ainda não tenha sido completamente elucidado (CAVAS; ERGENE-GÖZÜKARA, 2003; SOUZA; FONTANETTI, 2006).

A utilização dos herbicidas atrazina e ametrina na avaliação de toxicidade para organismos aquáticos têm sido rotineiramente conduzida (LOMBARDI et al., 2001; FARRÉ et al., 2002; BOTELHO et al., 2012; PAULINO et al., 2012; BLAHOVÁ et al., 2013) o que demonstra a preocupação por parte de pesquisadores quanto a presença destas duas moléculas nos ambientes aquáticos, assim como o uso do teste do MN e ANE na avaliação da mutagenicidade e genotoxidade (AYLLÓN; GARCÍA-VAZQUEZ, 2001; CAVAS; ERGENE-GOZUKARA, 2005; BOLOGNESI et al., 2006; PARVEEN; SHADAB, 2011).

Fischer-Scherl et al. (1991) demonstraram que o herbicida atrazina em concentrações que variam de 0,01 a 1000 µg L^{-1} induziu mudanças comportamentais e fisiológicas em trutas arco-íris, derivadas de alterações estruturais dos túbulos renais e do fígado. Para Hussein et al. (1996), as concentrações de atrazina que são consideradas tóxicas para diversas espécies animais dos ecossistemas aquáticos variam de 0,50 µg L^{-1} a 88,4 µg L^{-1}. Em outro estudo, Hayes et al. (2003) demostraram que 0,1 µg L^{-1} induziu o hermafroditismo em um sapo americano (*Rana pipiens*), bem como feminização em *Xenopus laevis* (HAYES et al., 2012).

As propriedades mutagênicas e genotóxicas do herbicida atrazina têm sido bastante estudadas utilizando uma variedade de ensaios. No entanto, os resultados tem-se mostrado contraditórios e não claro quanto o seu potencial genotóxico e mutagênico (CLEMENTS et al., 1997; GARAJ-VRHOVAC; ZELJEZIC, 2000; TENNANT et al., 2001; FREEMAN; RAYBURN, 2004; VENTURA et al., 2008).

No presente estudo, não foi observado uma relação dose-resposta para os parâmetros avaliados (MN e ANE), e no caso de núcleo *notched* somente a segunda menor concentração (0,5 µg L^{-1}) foi significativa, sendo que as maiores não foram. Já no caso de núcleo *lobed* e morte celular, as menores concentrações induziram a formação dessas alterações, embora não tenha apresentado diferença significativa. Já para a maior concentração foi observada formação de núcleo *lobed*.

Resultados contraditórios também foram encontrados por Ventura et al. (2008) que avaliaram a indução de MN e ANE após exposição de 6,25; 12,5 e 25 µg L^{-1} de atrazina para

tilápia (*Oreochromis niloticus*). Neste caso, foi observado que quando se considerou cada alteração separadamente, a menor concentração apresentou maiores frequências de células binucleadas, núcleos *blebbed*, *lobed* e *broken eggs* comparadas com as duas maiores concentrações. Além disso, somente a concentração de 6,25 µg L^{-1} foi capaz de induzir o aparecimento de núcleo *notched*.

Malik et al. (2004) avaliaram a genotoxicidade do herbicida atrazina utilizando sangue periférico de indivíduos saudáveis através da análise de troca de cromátides irmãs (TCI). A TCI é causada pela presença de lesões no DNA durante a sua replicação e tem sido uma ferramenta utilizada para medir o potencial genotóxico de uma molécula. Neste estudo, os autores não observaram uma relação dose-resposta em relação à frequência de TCI. Resultados similares a estes foram encontrados por Kligerman et al. (2000a).

Kligerman et al. (2000b) investigaram a indução de MN após exposição de três herbicidas da classe das triazinas (atrazina, simazina e cianazina) a culturas de linfócitos humanos, e concluíram que mesmo em concentrações consideradas tóxicas, a frequência de MN foi estatisticamente igual ao controle para todas as concentrações testadas.

Em contradição aos trabalhos citados anteriormente, o estudo de Clements et al. (1997) relatou que os danos ao DNA da Rã touro (*Rana catesbeiana)* mostrou ser dose-dependente através do ensaio do cometa. A genotoxidade da atrazina também foi confirmada no estudo de Garaj-Vrhovac e Zeljezic et al. (2000) para trabalhadores que foram ocupacionalmente expostos ao herbicida.

Trabalhos avaliando a toxicidade do herbicida ametrina para organismos aquáticos não tem sido realizados com a mesma frequência comparado ao atrazina, embora, os primeiros estudos foram realizados na década de 80 (JOHNSON; FINLEY, 1980; HARTLEY; KIDD, 1987). Lombardi et al. (2001) determinaram a CL_{50} (96h) para uma espécie de camarão em 7,54 mg L^{-1} em sistema estático. Já Farré et al. (2002) concluíram que metabólitos formados após sua biodegradação foram tóxicos para a bactéria *Vibrio fischeri*. É importante ressaltar que estudos avaliando o potencial genotóxico e mutagênico do herbicida ametrina através do teste do MN e ANE ainda não foram divulgados na literatura em forma de artigos científicos, e sendo assim, o presente trabalho será o primeiro.

De acordo com relatórios da United States Environmental Protection Agency (USEPA, 2005), a ametrina é considerada de ligeira a moderadamente tóxica para peixes e invertebrados de água doce. Estudos realizados por Pereira (2012) com peixes da espécie *Prochilodus lineatus* expostos ao herbicida ametrina e ao produto formulado à base de ametrina (Gesapax® 500) nas concentrações de 2,5 e 5,0 mg L^{-1} por 96 h, mostraram uma

redução do hematócrito nas duas concentrações testadas, assim como uma redução no número de eritrócitos quando exposto à concentração 5,0 mg L^{-1} de ambos os produtos. Ainda de acordo com Pereira (2012), os peixes apresentaram rompimento dos eritrócitos e aumento da glicemia, evidenciando uma provável resposta de estresse. Pelo ensaio do cometa, evidenciou-se o potencial genotóxico da ametrina para *P. lineatus,* uma vez que houve um aumento de danos no DNA dos eritrócitos dos peixes para a maior concentração de ambos os produtos.

Neste estudo, as alterações cariólise, núcleos vacuolizados e condensação do material nuclear foram classificados como morte celular. Segundo Ribeiro et al. (2003), células com núcleos vacuolizados e heteropicnóticos podem ser associadas a alterações morfológicas características de processos celulares necróticos e apoptóticos, respectivamente. Dessa maneira, de acordo com os resultados apresentados, em concentrações a partir de 0,5 µg L^{-1}, a ametrina apresenta uma alta potencialidade em induzir alterações nucleares relacionadas a eventos de morte celular (Tabela 7), diferentemente para o herbicida atrazina (Tabela 6).

Os dados obtidos no presente estudo sugerem que ambos os herbicidas possuem potencial genotóxico e mutagênico e estão de acordo com outros estudos que também demonstraram a incidência de MN e ANE em eritrócitos de peixes expostos a diferentes agentes químicos (DAS; NANDA, 1986; HOSE et al., 1987; HUGHES; HEBERT, 1991; ATEEQ et al., 2002; MORON et al., 2006; KUMAR et al., 2009; NWANI et al., 2011).

5.4 Conclusão

O presente estudo se propôs a desenvolver um método rápido e sensível para detecção de concentrações dos herbicidas atrazina e ametrina em águas utilizando a técnica LC-MS/MS por injeção direta da amostra para posteriormente avaliar o potencial mutagênico e genotóxico ao peixe *D. rerio*. O método cromatográfico mostrou ser linear, sensível, exato e preciso para determinação destas duas moléculas. Embora baixas concentrações tenham sido encontradas nas águas do rio Piracicaba, estas revelaram ter potencial mutagênico e genotóxico para *D. rerio* já que induziram a formação de MN e ANE.

Considerando os resultados de mutagenicidade e genotoxidade de atrazina para o organismo teste *D. rerio*, pode-se deduzir que o mecanismo de indução dessas alterações foi causado devido à atividade clastogênica desta molécula mesmo em concentrações abaixo da estabelecida pela legislação ambiental brasileira. Desta forma recomendamos que a resolução 357 do seja revista em relação a este produto. Devido à ampla ocorrência deste herbicida em ambientes aquáticos, o seu potencial genotóxico e mutagênico precisa rapidamente ser melhor

elucidado e entendido, já que conforme apresentado, os resultados mostram ser contraditórios. Para isso, recomenda-se a utilização em um mesmo estudo, de dois ou mais organismos de diferentes níveis tróficos assim como diferentes ferramentas empregadas para avaliar a genotoxidade e mutagenicidade.

Em relação ao herbicida ametrina, embora tenham sido determinadas baixas concentrações desta substância no rio Piracicaba, estas foram suficientes para induzirem a formação de MN e ANE, sugerindo assim o seu potencial mutagênico e genotóxico para *D. rerio*. Pelo fato de haver pouca literatura disponível sobre a toxicidade desta molécula para organimos aquático, acredita-se que a atividade mutagênica e genotóxica deste herbicida devem ser mais estudadas.

Referências

AL-SABTI, K.; METCALFE, C. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation Research**, Amsterdam, v.343, n.2-3, p.121-135, 1995.

ALDER, L.; GREULICH, K.; KEMPE, G.; VIETH. B. Residue analysis of 500 high priority pesticides: better by GC–MS or LC–MS/MS? **Mass Spectrometry Review**, New York, v.25, n.6, p.838-865, 2006.

ARMAS, E.D.; MONTEIRO, R.T.R.; ANTUNES, P.M.; SANTOS, M.A.P.F.; CAMARGO, P.B.; ABAKERLI, R.B. Diagnóstico espaço-temporal da ocorrência de herbicidas nas águas superficiais e sedimentos do Rio Corumbataí e principais afluentes. **Química Nova**, São Paulo, v.30, n.5, p.1119-1127, 2007.

ATEEQ, B.; ABDUL-FARAH, M.; ALI, M.N.; AHMAD, W. Induction of micronuclei and erythrocyte alterations in the catfish *Clarias batrachus* by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and butachlor. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 518, n.2, p. 135-144, 2002.

AYLLÓN, F.; GARCIA-VASQUEZ, E. Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in european minnow *Phoxinus phoxinus* and mollie *Poecilia latipinna*: an assessment of the fish micronucleus test. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 467, n.2, p. 177-186, 2000.

AYLLÓN, F.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Micronuclei and other nuclear lesions as genotoxicity indicators in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 49, n.3, p. 221–225, 2001.

BALINOVA, A.M.; MONDESKY, M. Pesticide contamination of ground and surface water in Bulgarian Danube plain. **Jounal of Environmental Science and Health. Part B**. London, v.34, n.1, p.33-46, 1999.

BENVENUTO, F.; MARÍN, J.M.; SANCHO, J.V.; CANOBBIO, S.; MEZZANOTTE, V.; HERNÁNDEZ, F. Simultaneous determination of triazines and their main transformation

products in surface and urban wastewater by ultra-high-pressure liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v.397, n.7, p.2791-2805, 2010.

BLAHOVÁ, J.; PLHALOVA, L.; HOSTOVSKY, M.; DIVIŠOVA, L.; DOBŠIKOVA, R.; MIKULIKOVA, I.; ŠTEPANOVA, S.; SVOBODOVA, Z. Oxidative stress responses in zebrafish *Danio rerio* after subchronic exposure to atrazine. **Food Chemical and Toxicology**. 2013. In press. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23499751#>. Acesso em: 09 Jun. 2013.

BOLOGNESI, C.; PERRONE, E.; ROGGIERI, P.; PAMPANIN, D.M.; SCIUTTO, A. Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish exposed to xenobiotics under controlled conditions. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v.78, n.1, p.S93–S98, 2006.

BOPP, S. K..; LETTIERI, T. **Gene expression profile assessment in Zebrafish (*Danio rerio*).** Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities, 2007.

BOPP, S.K.; MINUZZO, M.; LETTIERI, T. **The Zebrafish (*Danio rerio*): an Emerging model organism in the environmental field**. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities, 2006.

BOTELHO, R.G.; SANTOS, J.B.; FERNANDES, K.M.; NEVES, C.A. Effects of atrazine and picloram on grass carp: acute toxicity and histological assessment. **Toxicological and Environmental Chemistry**, New York**,** v.94, n.1, p.121-127, 2012.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução n.357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências**. Brasilia,: CONAMA, 2005. 27 p.

CARRASCO, K.R.; TILBURY, K.L.; MYERS, M.S. Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science**, Ottawa, v.47, n.11, p.2123–2136, 1990.

CAVAS, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) as cyto-genotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent. **Mutation Research**, Amsterdam, v.538, n.1-2, p.81-91, 2003.

CAVAS, T.C; ERGENE-GOZUKARA, S. Micronucleus test in fish cells: a bioassay for in situ monitoring of genotoxic pollution in marine environment. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v.46, n.1, p.64–70, 2005.

CAVAS, T. In vivo genotoxicity evaluation of atrazine and atrazine-based herbicide on fish *Carassius auratus* using the micronucleus test and the comet assay. **Food Chemical and Toxicology**, v.49, n.6, p.1431–1435, 2011.

CLEMENTS, C.; RALPH, S.; PETRAS, M. Genotoxicity of select herbicides in *Rana catesbeiana* tadpoles using the alkaline single-cell gel DNA electrophoresis (comet) assay. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v.29, n.3, p. 277–288, 1997.

DAS, R.K.; NANDA, N.K. Induction of micronuclei in peripheral erythrocytes of fish *Heteropneustes fossilis* by mitomycin-C and paper mill effluent. **Mutation Research**, Amsterdam, v.175, p. 67-71, 1986.

DOS SANTOS, L.B.O.; ABATE, G.; MASINI, J.C. Developing a continuous flow-square wave voltammetry method for determination of atrazine in soil solutions using the hanging mercury drop electrode. **Journal of Brazilian Chemical Society**, Campinas, v.17, n.1, p. 36-42, 2006.

EUROPEAN COMMISSION. **Directorate general health and consumer protection**: SANCO/2009/10684; Method of validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed. Brussels: European Commission, 2009.

FARRÉ, M.; FERNANDEZ, J.; PAEZ, M.; GRANADA, L.; BARBA, L.; GUTIERREZ, H.M.; PULGARIN, C.; BARCELÓ, D. Analysis and toxicity of methomyl and ametryn after biodegradation. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v.373, n.8, p.704-709, 2002.

FISCHER-SCHERL, T.; VEESER, A.; HOFFMAN, R.W.; KÜHNHAUSER, C.; NEGELE, R.D.; EWRINGMANN, T. Morphological effects of acute and chronic atrazine exposure in rainbow trout *(Oncorhynchus mykiss)*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v.20, n.4, p.454-461, 1991.

FREEMAN, J.L.; RAYBURN, A.L. In vivo genotoxicity of atrazine to anuran larvae. **Mutation Research**, Amsterdam, v.560, n.1, p.69–78, 2004.

GARCÍA-GALÁN, M.J.; DÍAZ-CRUZ, M.S.; BARCELÓ, D. Determination of triazines and their metabolites in environmental samples using molecularly imprinted polymer extraction, pressurized liquid extraction and LC-tandem mass spectrometry. **Journal of Hidrology**, Amsterdam, v.383, n.1, p.30-38, 2010.

GARAJ-VRHOVAC, V.; ZELJEZIC, D. Evaluation of DNA damage in workers occupationally exposed to pesticides using single-cell gel electrophoresis (SCGE) assay, pesticide genotoxicity revealed by comet assay. **Mutation Research**, Amsterdam, v.469, n.2, p.279–285, 2000.

GUILHERME, S.; VÁLEGA, M.; PEREIRA, M.E.; SANTOS, M.A.; PACHECO, M. Erythrocytic nuclear abnormalities in wild and caged fish (*Liza aurata*) along an environmental mercury contamination gradient. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v.70, n.3, p.411-421, 2008.

HARTLEY, D.; KIDD, H. **The agrochemical handbook**. 2nd ed. London: Royal Society of Chemistry, 1987.

HAYES, T.; HASTON, K.; TSUI, M.; HOANG, A.; HAEFFELE, C.; VONK, A. Atrazine-induced hermaphroditism at 0.1 ppb in American leopard frogs (*Rana pipiens*): laboratory and

field evidence. **Environmental Health and Perspectives**, Research Triangle Park, v.111, p. 568-575, 2003.

HAYES, T.B.; KHOURY, V.; NARAYAN, A.; NAZIR, M.; PARK, A.; BROWN, T.; ADAME, L.; CHAN, E.; BUCHHOLZ, D.; STUEVE, T.; GALLIPEAU, S. Atrazine induces complete feminization and chemical castration in male African clawed frogs (*Xenopus laevis*). Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.107, n.10, p.4612-4617, 2010.**

HEDDLE, J.A.; HITE, M.; IRKHART, B.; MACGREGOR, J.T.E.; SALAMONE, M.F. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity: a measure of the US environmental protection agency - Gene-Tox program. **Mutation Research**, Amsterdam, v.123, n.1, p.61-118, 1983.

HILDEBRANDT, A.; GUILLAMÓN, M.; LACORTE, S.; TAULER, R.; BARCELÓ, D. Impact of pesticides used in agriculture and vineyards to surface and groundwater quality (North Spain). **Water Research**, Oxford, v.42, n.13, p.3315-3326, 2008.

HOSE, J.E.; CROSS, J.N.; SMITH, S.G.; DIELL, D. Elevated circulating erythrocyte micronuclei in fishes from contaminated sites of southern California. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.22, n.3, p.167-176, 1987.

HUANG, S.-B.; MAYER, T. J.; YOKLEY, R. A.; PEREZ, R. Direct aqueous injection liquid chromatography/electrospray ionization-mass spectrometry/mass spectrometry analysis of water for atrazine, simazine, and their chlorotriazine metabolites. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.54, n.3, p.713–719, 2006.

HUANG, S.B.; MAYER, T.J.; YORKLEY, R.A. Direct aqueous injection LC-ESI/MS/MS analysis of water for 11 chloro- and thiomethyltriazines and metolachlor and its ethanesulfonic and oxanilic acid degradates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v, 56, n.8, p.2595-2602, 2008.

HUGHES, J.B.; HEBERT, A.T. Erythrocyte micronuclei in winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) results of field surveys during 1980-1988 from Virginia to Nova Scotia and in Long Island Sound. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v.20, n.4, p.474-479, 1991.

HUSSEIN, S.Y.; EL-NASSER, M.A.; AHMED, S.M. Comparative studies on the effects of herbicide atrazine on freshwater fish *Oreochromis niloticus* and *Chrysichthyes auratus at Assiut, Egypt*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v.57, n.3, p.503-510, 1996.

JACOMINI, A.E.; CAMARGO, P.B.; AVELAR, W.E.P.; BONATO, P.S. Determination of ametryn in river water, river sediment and bivalve mussels by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry**. Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.20, n.1, p.107-116, 2009.

JOHNSON, W.W.; FINLEY, M.T. **Handbook of acute toxicity of chemicals to fish and aquatic invertebrates**. Res Publ 137. Fish Wildlife Service, Washington, DC, 1987.

KAN, Y.; CENGIZB, E.I.; UGURLUC, P.; YANARD, M. The protective role of vitamin E on gill and liver tissue histopathology and micronucleus frequencies in peripheral erythrocytes of *Oreochromis niloticus* exposed to deltamethrin. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v.34, n.2, p.170-179.

KLIGERMAN, A.D.; DOERR, C.L.; TENNANT, A.H.; PENG, B. Cytogenetic studies of three atrazine herbicides 11 In vivo micronucleus studies in mouse bone marrow. **Mutation Research**, Amsterdam, v.471, n.1-2, p.107–112, 2000a.

KLIGERMAN, A.D; DOERR, C.L.; TENNANT, A.H.; ZUCKER, R.M. Cytogenetic studies of three triazine herbicides. I. In vitro studies. **Mutation Research**, Amsterdam, v.465, n.1-2, p.53–59, 2000b.

KUMAR, R.; NAGPURE, N.S.; KUSHUWAHA, B.; SRIVASTAVA, S.K.; LAKRA, W.S. Investigation of the genotoxicity of malathion to freshwater teleost fish *Channa punctatus* (Bloch) using the micronucleus test and comet assay. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v.58, n.1, p.123–130, 2009.

KUSTER, M.; ALDA, M.L.; BARCELÓ, D. Analysis of pesticides in water by liquid chromatography-tandem mass spectrometric techniques. **Mass Spectrometry Review**, New York, v.25, n.6, p.900-916, 2006.

LAABS, V.; AMELUNG, W.; PINTO, A.A.; WANTZEN, M.; DA SILVA, C.J.; ZECH, W. Pesticides in surface water, sediment, and rainfall of the northeastern Pantanal basin, Brazil. **Journal of Environmental Quality**, Madson, v. 31, n.5, p.1636-1648, 2002.

LENTZA-RISOS, C. Determination of triazine residues in water: comparison between a gas chromatographic method and an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v.57, n.3, p.413-420, 1996.

LI, Z.; CHEN, L.; GAO, H.; DONG, L.; ZHAO, J. Determination of triazines in surface water using solid phase extraction-high performance liquid chromatography. **Chinese Journal of Cromatography**, Dalian Shi, v.24, n.3, p.267-270, 2006.

LOMBARDI, J.V.; MACHADO-NETO, J.G.; BROSSI-GARCIA, H.L.; MARQUES, A.; KUBO, E. Acute toxicity of the pesticides endosulfan and ametryne to the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* De Man. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v.67, n.5, p.665–671, 2001.

MALIK, S.I.; TERZOUDI, G.I.; PANTELIAS, G.E. SCE analysis in G2 lymphocyte prematurely condensed chromosomes after exposure to atrazine: the non-dose-dependent increase in homologous recombinational events does not support its genotoxic mode of action. **Cytogenetic and Genome Research**, Basel, v.104, n.1-4, p. 315-319, 2004.

MONTEIRO, V.; CAVALCANTE, D.G.S.M.; VILELA, M.B.F.A.; SOFIA, S.H.; MARTINEZ, C.B.R. In vivo and in vitro exposures for the evaluation of the genotoxic effects of lead on the Neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v.104, n.3-4, p. 291-298, 2011.

MORON, S.E.; POLEZ, V.L.P.; ARTONI, R.F.; RIBAS, J.L.C.; TAKAHASHI, H.K. Estudo de alterações na concentração dos íons plasmáticos e da indução de micronúcleos em *Piaractus mesopotamicus* exposto ao herbicida atrazina. **Journal of Brazilian Society of Ecotoxicology**, Itajaí, v.1, n.1, p.27-30, 2006.

MURANLI, F.D.G.; GUNER, U. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in erythrocytes of mosquito fish (*Gambusia affinis*) following exposure to the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 726, n.2, p. 104–108, 2011.

NAGARAJU, D.; HUANG, S.D. Determination of triazine herbicides in aqueous samples by dispersive liquid–liquid microextraction with gas chromatography–ion trap mass spectrometry. **Journal of Chromatography. A**, Amsterdam, v.1161, n.1-2, p.89-97, 2007.

NWANI, C.D.; NAGPURE, N.S.; KUMAR, R.; KUSHWAHA, B.; KUMAR, P.; LAKRA, W.S. Mutagenic and genotoxic assessment of atrazine-based herbicide to freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus test and single cell gel electrophoresis. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v.31, n.2, p.314-322, 2011.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Guideline 203 for testing of chemicals:** fish, acute toxicity test; effects on biotic systems. Paris: OECD, 1992. 9 p.

PACHECO, M.; SANTOS, M.A. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in the erythrocytes of *Anguilla anguilla* L. exposed either to cyclophosphamide or to bleached kraft pulp mill effluent. **Frenesius Environmental Bulletin**, Freising, v.5, n.11-12, p.746–751, 1996.

PALMA, P.; KUSTER, M.; ALVARENGA, P.; PALMA, V.L.; FERNANDES, R.M.; SOARES, A.M.V.M.; LÓPEZ DE ALBA, M.J.; BARCELÓ, D.; BARBOSA, I.R. Risk assessment of representative and priority pesticides, in surface water of the Alqueva reservoir (South of Portugal) using on-line solid phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Environment International**, Amsterdam, v.35, n.3, p.545-551, 2009.

PARVEEN, N.; SHADAB, G.G.H.A. Evaluation of micronuclei and haematological profiles as genotoxic assays in *Channa punctatus* exposed to Malathion. **International Journal of Science and Nature**, Lucknow, v.2, n.3, p.625–631, 2011.

PAULINO, M.G.; SOUZA, N.E.; FERNANDES, M.N. Subchronic exposure to atrazine induces biochemical and histopathological changes in the gills of a Neotropical freshwater fish, *Prochilodus lineatus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v.80, n.1, p.6-13, 2012.

PEREIRA, L. **Efeitos dos herbicidas clomazone e ametrina em parâmetros funcionais da espécie de peixe neotropical *Prochilodus lineatus***. 2012. Tese. (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2012.

RAMSDORF, W. **Avaliação da toxicidade dos compostos fipronil, nitrato de chumbo e naftaleno em peixes**. 2011. Tese. (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. **Mutagênese ambiental**. Canoas: ULBRA, 2003. 355 p.

SCHIRMER, K. Proposal to improve vertebrate cell cultures to establish them as substitutes for the regulatory testing of chemicals and effluents using fish. **Toxicology**, Limerick, v.224, n.3, p.163-183, 2006.

SCHMID, W. **The micronucleus test for cytogenetics analysis**. In: De Serres, F.J; Hollaender, A. (Eds.). **Chemical mutagens:** principles and methods for their detection. 2 ed. New York: Plenum Press, 1976. 53 p.

SOUZA, T.S.; FONTANETTI, C.S. Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent. **Mutation Research**, Amsterdam, v.605, n.1-2, p. 87-93, 2006.

STRUNJAK-PEROVIC, I.; COZ-RAKOVAC, R.; POPOVIC, N.T.; JADAN, M. Seasonality of nuclear abnormalities in gilthead sea bream *Sparus aurata* (L.) erythrocytes. **Fish Physiology and Biochemistry**, Dordrecht, v.35, n.2, p.287–291, 2009.

TANABE, A.; KAWATA, K. Determination of triazine pesticides and related compounds in environmental water by Liquid Chromatography: mass spectrometry. **Analytical Sciences**, Tokyo, v. 20, n.1, p.227-230, 2004.

TENNANT, A.H.; PENG, B.; KLIGERMAN, A.D. Genotoxicity studies of three triazine herbicides: in vivo studies using the alkaline single cell gel-electrophoresis (SCGE) assay. **Mutation Research**, Amsterdam, v.493, n.1-2, p.1–10, 2001.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Protocol for EPA approval of new methods for organic and inorganic analytes in wastewater and drinking water.** Washington: USEPA, 1999.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **R.e.d. Facts – Ametryn**. Disponível em: <www.bdtd.ufscar.br/htdocs/tedeSimplificado//tde_busca/arquivo.php?codArquivo=5256>. Acesso: 2 jul. 2013.

VENTURA, B.D.C.; DE ANGELIS, D.F.; MARIN-MORALES, M.A. Mutagenic and genotoxic effects of the Atrazine herbicide in *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae) detected by the micronuclei test and the comet assay. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v.90, n.1, p. 42-51, 2008.

WESTERFIELD, M. **The Zebrafish book:** guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*). University of Oregon, 2000. Disponível em <http://zfin.org/zf_info/zfbook/zfbk.html>. Acesso em 2 jul. 2013.

YOKLEY, R. A.; CHEUNG, M. W. Analytical method for the determination of atrazine and its dealkylated chlorotriazine metabolites in water using gas chromatography/mass selective detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.48, n.10, p.4500–4507, 2000.

6. TOXICIDADE AGUDA DA VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA ORGANISMOS AQUÁTICOS ANTES E APÓS A CORREÇÃO DO PH [2]

Resumo

O objetivo deste estudo foi investigar a toxicidade aguda da vinhaça para cladóceros e peixes antes e após a correção do pH utilizando teste de toxicidade aguda. Modelos de regressão linear e quadrática foram ajustados para demonstrar a relação dose-resposta entre as concentrações da vinhaça e os parâmetros avaliados. A concentração letal média ($CL_{50\text{-}48h}$) da vinhaça antes da correção do pH para *Ceriodaphnia dubia* e *Daphnia magna* foram 0,67 e 0,80%, respectivamente, e 2,62% para *Danio rerio*. Após a correção do pH, os valores de $CL_{50\text{-}48h}$ aumentaram para todos os organismos demonstrando redução da toxicidade. Conclui-se que apesar da vinhaça possuir alta toxicidade aguda para organismos aquáticos, esta pode ser reduzida após a correção do pH.

Palavras-chave: *Danio rerio*. Microcrustáceo. pH. Toxicidade aguda. Vinhaça.

Abstract

The purpose of this study was to investigate the toxicity of sugarcane vinasse to cladocerans and fish before and after pH correction using an acute toxicity test. Linear and quadratic regression models were adjusted to demonstrate the concentration–response relationship between vinasse and the endpoints evaluated. The median lethal concentration ($LC_{50\text{-}48h}$) of vinasse before pH correction to *Ceriodaphnia dubia* and *Daphnia magna* were 0.67 e 0.80% respectively, and the median lethal concentration ($LC_{50\text{-}96h}$) to *Danio rerio* was 2.62%. After pH correction, the values increased for all organisms demonstrating a decrease in toxicity. This study reported marked toxicity of vinasse to aquatic organisms with toxicity reduction after pH correction.

Keywords: Acute toxicity. *Danio rerio*. Microcrustaceans. pH.Vinasse.

6.1 Introdução

A cana-de-açúcar é uma das maiores monoculturas cultivadas no Brasil, e deste modo, a indústria do etanol é muito importante para a economia do país. A colheita total estimada entre os anos de 2012 e 2013 foi de 602,2 milhões de toneladas, representando um aumento de 5,4% em relação a 2011 e 2012 (571,4 milhões de toneladas) (CONABE, 2012). Como todas as atividades industriais, o setor da cana-de-açúcar, ou seja, a indústria do etanol também produz resíduos que se não tratados adequadamente podem resultar em problemas aos ambientes aquáticos, uma vez que estes são geralmente o destino final dos efluentes industriais (FERREIRA et al., 2012).

Vinhaça, também conhecida como água residual da indústria sucroalcooleira, é um efluente gerado a partir da destilação do etanol. Estima-se que para cada litro de etanol obtido, gera-se de 8 a 18 litros de vinhaça (PARNAUDEAU et al., 2008) com composição variando de acordo com os equipamentos e materiais empregados no processo de destilação (KUMAR et al., 1998; NAIK; JAGADEESH; ALAGAWADI, 2008). No Brasil, a vinhaça tem sido utilizada como fertilizante de culturas de cana-de-açúcar devido à sua riqueza em nutrientes como potássio, cálcio e nitrogênio. Embora seja aplicada no solo, este resíduo pode se deslocar para os ambientes aquáticos via escoamento superficial e lixiviação. Devido à sua coloração marrom, alta quantidade de matéria orgânica (BELTRAN; DOMINGUEZ; PARTIDO, 2005; JIMENEZ et al., 2006; PANT; ADHOLEYA, 2007) e baixo pH, a vinhaça é tida como um resíduo problemático para os ambientes aquáticos.

De acordo com Wilkie, Riedesel e Owens (2000), efluentes de cores escuras exercem impacto negativo sobre o ambiente pelo fato de inibirem o crescimento da flora aquática. Lele, Rajadhyaksha e Joshi (1989) relataram que uma produção de médio porte de etanol (10^6 L) por ano, gera vinhaça com um nível de poluição equivalente aos resíduos de uma cidade com uma população de 500.000 habitantes.

Muitas tecnologias estão surgindo a respeito do reuso e tratamento da vinhaça (MANE et al., 2006; MOHANA; ACHARYA; MADAMWAR, 2009). Atualmente, existem muitas opções de tratamentos físico-químicos e biológicos que podem reduzir sua toxicidade através da degradação de seus compostos orgânicos. Normalmente, os tratamentos físico-químicos envolvem muitos reagentes para oxidar estes compostos, ao passo que, os tratamentos biológicos podem ser classificados em aeróbicos ou anaeróbicos. As técnicas aeróbicas tais como lagoas de aeração e unidades de lodo ativado, são freqüentemente utilizadas apesar da grande quantidade de lama gerada que precisam ser subseqüentemente eliminados. Já as

técnicas anaeróbicas possuem baixos custos e produzem gases como hidrogênio e metano, que podem ser utilizados pela própria indústria (BENITEZ et al., 2003; BELTRAN; DOMINGUEZ; PARTIDO, 2005; PANT; ADHOLEYA, 2007).

O objetivo deste estudo foi de avaliar toxicidade a aguda da vinhaça de cana-de-açúcar para os microcrustáceos *Ceriodaphnia dubia* e *Daphnia magna*, e para o peixe *Danio rerio* antes e após a correção do seu pH.

6.2 Materiais e Métodos

6.2.1 Correção do pH

A vinhaça utilizada neste estudo foi adquirida de uma indústria sucroalcooleira localizada na cidade de Piracicaba (São Paulo, Brasil). A correção do pH foi feito para 6,5 com hidróxido de sódio (NaOH) a 1,0 mol L^{-1}.

6.2.2 Manutenção e delineamento experimental com *C. dubia*

Para manutenção de *C. dubia* e condução dos testes de toxicidade aguda seguiu-se a metodologia NBR 13373 da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 2005). As culturas (água reconstituída) foram mantidas em incubadoras com temperatura de 25ºC ±2 com fotoperíodo de 16 horas luz e 8 horas escuro no Laboratório de Ecotoxicologia Aquática do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (Piracicaba, São Paulo). A água reconstituída foi preparada usando água deionizada e reagentes químicos de acordo com a ABNT (2005). O meio de cultivo foi renovado duas vezes por semana e para alimentação foi fornecido alga *Pseudokirchneriella subcapitata* três vezes por semana na concentração de 1 x 10^5 células por organismos (ABNT, 2005).

Neste estudo, a vinhaça foi diluída utilizando meio de cultivo. Seis concentrações foram estabelecidas com quatro réplicas mais o grupo controle. Cinco organismos com idade entre 6 a 24 horas foram adicionados em cada réplica. A duração do teste foi 48 horas no escuro e sem alimentação. As concentrações da vinhaça utilizada foram 0,391, 0,521, 0,781, 1,042, 1,562, e 2,083% antes da correção do pH e 0,391, 0,521, 0,781, 1,562, 3,125 e 4,167% após a correção do pH. Após 48 horas de exposição a concentração letal média ($CL_{50\text{-}48h}$) foi determinada.

6.2.3 Manutenção e delineamento experimental com *D. magna*

Os procedimentos para a manutenção e condução dos testes de toxicidade aguda foram realizados de acordo com a NBR 12713 da ABNT (2003). As culturas foram mantidas em imcubadora em água reconstituída preparada usando água deionizada e reagentes químicos de acordo com a ABNT (2003) a uma temperatura de 20ºC ±2 com fotoperíodo de 16 horas luz e 8 horas escuro no Laboratório de Ecotoxicologia Aquática do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (Piracicaba, São Paulo). O meio de cultivo foi renovado duas vezes por semana e para alimentação foi fornecido alga *P. subcapitata* três vezes por semana na concentração de 1×10^7 células por organismos (ABNT, 2003).

Seis concentrações foram estabelecidas com quatro réplicas mais o grupo controle. Cinco organismos com idade entre 2 a 26 horas foram adicionados em cada réplica. As concentrações utilizadas foram 0,391, 0,521, 0,781, 1,042, 1,562 e 2,083% antes da correção do pH e 0,781, 1,562, 3,125, 4,167, 6,25 e 8,34% após a correção do pH. Após 48 horas de exposição a concentração letal média ($CL_{50\text{-}48h}$) foi determinada.

6.2.4 Manutenção e delineamento experimental com *D. rerio*

Durante o estudo, adultos de *D. rerio* (0,2-0,5 g e 2-3 cm) foram adquiridos de um mesmo fornecedor localizado na cidade de Piracicaba, São Paulo, Brasil. Antes do início do teste, os indivíduos foram mantidos em aquário de 60 litros de caspacidade com água de abastecimento (desclorada e com oxigênio dissolvido = 7,0 -7,5 mg L^{-1}, pH = 7,1-7,8, condutividade = 125–130 µS cm^{-1} e dureza = 33-50 $CaCO_3$) com aeração contínua durante sete dias para aclimatação. Durante o período de aclimatação, os organismos foram alimentados duas vezes por dia com ração para peixe (Tetramin).

Para realização do teste de toxicidade, seguiu-se o Guideline 202 da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD, 1992). As concentrações utilizadas no teste antes e após a correção do pH foram: 1,562, 2,083, 3,125, 4,167, 6,25, e 8,34%. O experimento foi realizado em béqueres de 2 litros com aeração contínua. Todos os tratamentos foram conduzidos com duas réplicas mais o grupo controle (água de manutenção) com sete organismos em cada. Todas as concentrações foram preparadas utilizando-se a mesma água que os organismos foram mantidos. A duração do teste foi de 96 horas em sistema estático e após o período de exposição foi determinada a concentração da vinhaça que causa 50% de letalidade ($CL_{50\text{-}96h}$) aos organismos testados.

6.2.5 Análise estatística

Tanto a CL_{50} antes e após a correção do pH para *C. dubia* e *D. magna* como para *D. rerio* foi determinada utilizando-se o método Trimmed Spearman Karber (HAMILTON; RUSSO; THURSTON, 1977). Um modelo de regressão linear e quadrática foram ajustados para avaliar a relação dose-resposta entre a vinhaça e os efeitos avaliados para cada grupo de organismos antes e após a correção do pH através do programa estatístico SAS versão 9.2.

6.3 Resultados e Discussão

A composição da vinhaça utilizada no estudo é apresentada na Tabela 1. Os valores de CL_{50} (48h) da vinhaça para *C. dubia* e *D. magna* e a CL_{50} (96h) para *D. rerio* antes e após a correção do pH estão apresentados na Tabela 2. De acordo com estes valores a vinhaça foi considerada tóxica para os organismos testados, pois mesmo após sua diluição esta apresentou baixo valores de CL_{50}. É interessante notar que *C. dubia* foi mais sensível que *D. magna* e *D. rerio*, sendo que o último foi o mais resistente dentre os organismos testados. Após a correção do pH, observou-se redução da toxicidade, já que os valores de CL_{50} aumentaram para todos os organismos.

A mortalidade de *C. dubia* após exposição à vinhaça antes da correção do pH está apresentado na Tabela 3. Neste caso, quando *C. dubia* foi exposta à vinhaça antes da correção, 100% de mortalidade foram observados nas últimas três concentrações (1,04, 1,56 e 2,08%). Quando a exposição ocorreu após a correção, a única concentração que causou 100% de mortalidade foi a maior (4,16%).

Tabela 1 - Composição da vinhaça utilizada no estudo

Vinhaça pura	
pH	4,00
Densidade	0,94 g mL^{-1}
Resíduo seco a 100-110ºC	7,88 g L^{-1}
Matéria orgânica total (combustão)	5,70 g L^{-1}
Carbono total (orgânico e mineral)	3,17 g L^{-1}
Nitrogênio total	0,39 g L^{-1}
Fósforo total (P_2O_5)	0,03 g L^{-1}
Potássio (K_2O)	1,64 g L^{-1}
Cálcio	0,38 g L^{-1}
Magnésio	0,16 g L^{-1}
Enxofre	0,29 g L^{-1}
Cobre total	1,00 mg L^{-1}
Manganês total	6,00 mg L^{-1}
Zinco total	1,00 mg L^{-1}
Ferro total	35,00 mgL^{-1}
Relação C/N	8/1

Tabela 2 - Valores de CL_{50} (%) da vinhaça para cada organismo antes e após a correção do pH

Vinhaça	**Organismos**		
	C. dubia	*D. magna*	*D. rerio*
Antes da correção do pH	0,67	0,80	2,62
Após a correção do pH	2,99	5,62	8,34

Tabela 3 - Mortalidade (%) de *C. dubia* após exposição (48 horas) à vinhaça antes e após a correção do pH.

Tratamentos (%)	**Antes da correção do pH** Mortalidade (%)
Controle	0
0,39	0
0,52	0
0,78	85
1,04	100
1,56	100
2,08	100

Tratamentos (%)	**Após a correção do pH** Mortalidade (%)
Controle	0
0,39	0
0,52	0
0,78	0
1,56	0
3,12	20
4,16	100

A relação entre o pH e as concentrações de vinhaça, bem como a relação dose-resposta entre vinhaça e mortalidade para *C. dubia* antes da correção do pH está apresentada na Figura 1A. A relação dose-resposta entre vinhaça e mortalidade de *C. dubia* após a correção do pH é apresentada na Figura 1B.

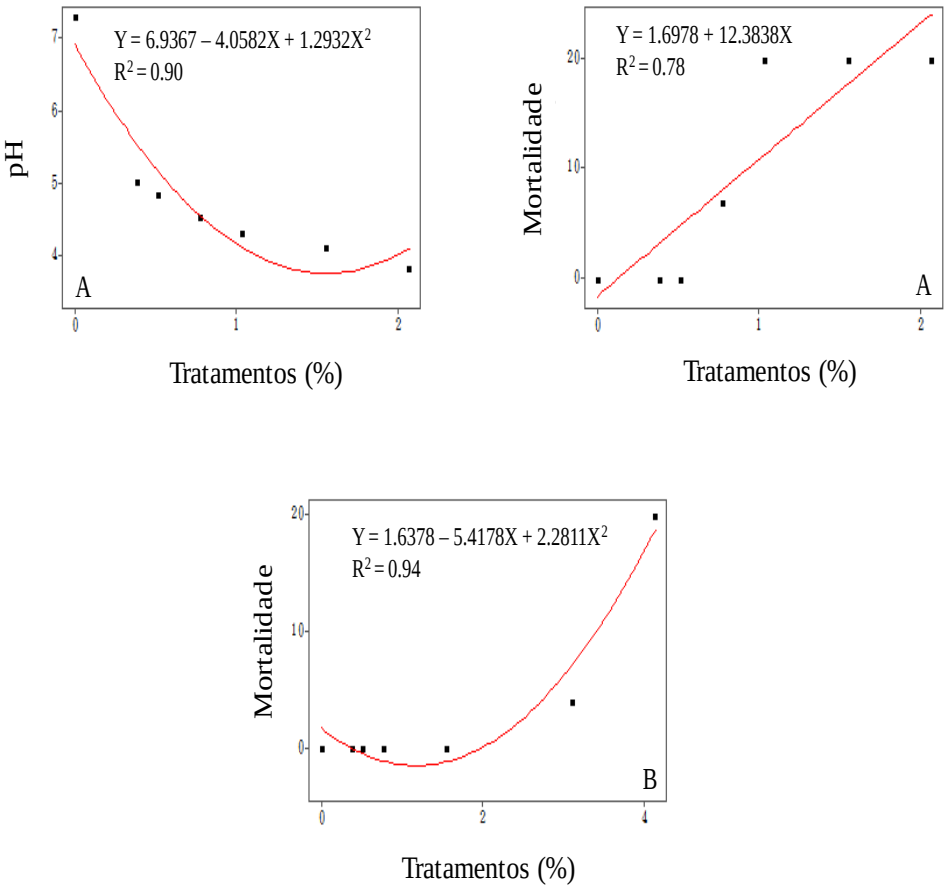

Figura 1 - Relação entre pH e concentrações de vinhaça e relação dose-resposta entre vinhaça e mortalidade de *C. dubia* antes da correção do pH (A). Relação dose-resposta entre vinhaça e mortalidade de *C. dubia* após a correção do pH (B)

A mortalidade de *D. magna* após exposição à vinhaça antes e após a correção do pH está apresentada na Tabela 4. Quando *D. magna* foi exposta à vinhaça antes da correção do pH, a primeira concentração que causou 100% de mortalidade foi 1,04%. Por outro lado, quando o pH foi corrigido, a primeira concentração que causou 100% de mortalidade foi 8,34%, o que demonstra redução da toxicidade. As concentrações 0,78 e 1,56% de vinhaça foram utilizadas em ambos os testes (antes e após a correção), e quando *D. magna* foi exposta à vinhaça antes da correção, os valores de mortalidade foram 35 e 100%, respectivamente, no entanto, após a correção do pH não foram observados efeitos.

Tabela 4 - Mortalidade (%) de *D. magna* após exposição (48 horas) à vinhaça antes e após a correção do pH

Tratamentos (%)	**Antes da correção do pH** Mortalidade (%)
Controle	0
0,39	0
0,52	0
0,78	35
1,04	100
1,56	100
2,08	100
Tratamentos (%)	**Após a correção do pH** Mortalidade (%)
Controle	0
0,78	0
1,56	0
3,12	0
4,16	0
6,25	85
8,34	100

A relação entre pH e as concentrações de vinhaça e a relação dose-resposta entre vinhaça e mortalidade de *D. magna* antes da correção do pH é apresentado na Figura 2A. A relação dose-resposta entre vinhaça e mortalidade de *D. magna* após a correção do pH pode ser observada na Figura 2B.

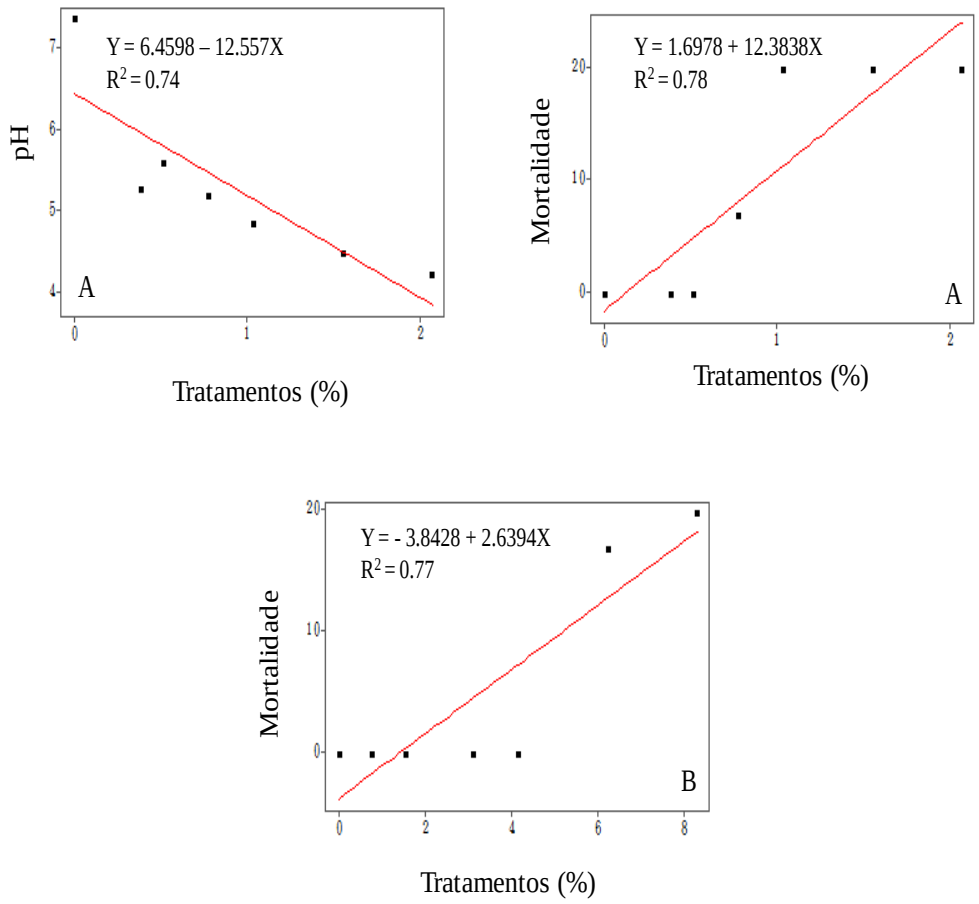

Figura 2 - Relação entre pH e concentrações de vinhaça e relação dose-resposta entre vinhaça e mortalidade de *D. magna* antes da correção do pH (A). Relação dose-resposta entre vinhaça e mortalidade de *D. magna* após a correção do pH (B)

A mortalidade de *Danio rerio* após exposição à vinhaça antes e após a correção do pH está apresentada na Tabela 5. Após a correção do pH, a mortalidade foi menor comparado a antes da correção, exceto na primeira concentração. A relação entre pH e concentrações de vinhaça bem como a relação dose-resposta para *D. rerio* antes da correção do pH está apresentada na Figura 3(A). Já, a relação entre pH e concentrações de vinhaça e relação dose-resposta para *D. rerio* após a correção está apresentado na Figura 3(B).

Tabela 5 - Mortalidade (%) de *D. rerio* após exposição à vinhaça (48 horas) antes e após a correção do pH

Tratamentos (%)	**Antes da correção do pH** Mortalidade (%)	**Após a correção do pH** Mortalidade (%)
Controle	0	0
1,56	0	7,14
2,08	14,28	7,14
3,12	78,57	14,28
4,16	100	21,42
6,25	100	14,28
8,34	100	50,00

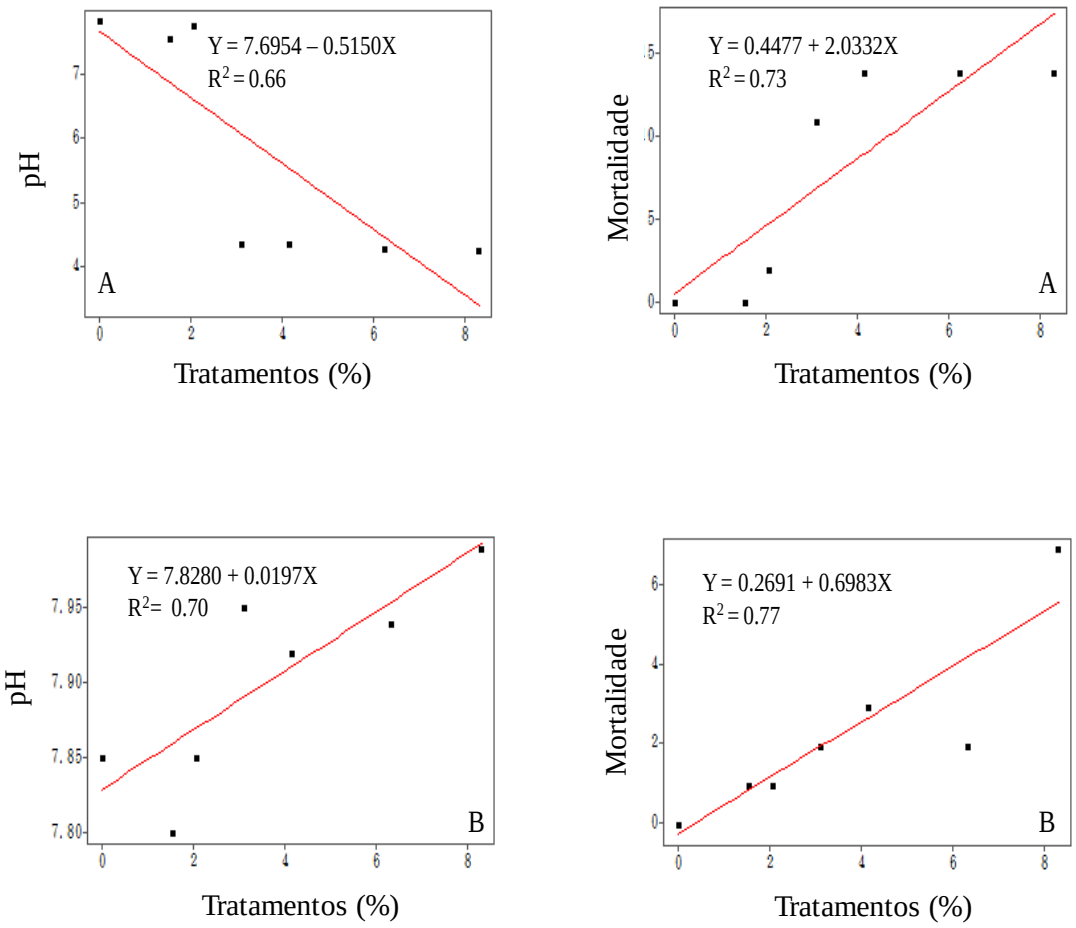

Figura 3 - Relação entre pH e concentrações de vinhaça e relação dose-resposta para *D. rerio* antes da correção do pH (A). Relação entre pH e concentrações de vinhaça e relação dose-resposta para *D. rerio* após a correção do pH (B)

Parâmetros do modelo de regressão (pH x mortalidade) estão apresentados nas Tabelas 6 e 7. Para *C. dubia*, uma regressão linear (β_0 = intercepto e β_1= inclinação) e quadrática (β_0 = intercepto, β_1= velocidade inicial, e β_2 = aceleração da reação) foram ajustadas correspondendo antes e após a correção do pH, respectivamente. Para *D. magna* e *D. rerio* uma regressão linear foi ajustada antes e após a correção do pH onde β_0 corresponde ao intercepto e β_1 à aceleração. É importante observar que para *D. magna* e *D. rerio*, a inclinação após ao correção do pH foi menor ($p<0,05$) comparado a antes da correção, demonstrando redução da toxicidade, já que neste caso quanto maior é a inclinação maior é a toxicidade.

Tabela 6 - Parâmetros da regressão estimada para mortalidade (M) de *C. dubia*, *D. magna* e *D. rerio* antes da correção do pH

Organismo	Parâmetros	Estimate (M)	Valor de t	Valor de p	Estimate (pH)	Valor de t	Valor de p
D. rerio	β_0	0,4477^{ns}	0,18	0,8653	7,6954*	10,24	0,0002
	β_1	2,0332*	3,66	0,0146	- 0,5150*	- 3,09	0,0271
D. magna	β_0	- 1,6978^{ns}	- 0,51	0,6337	6,4598*	17,36	< 0,0001
	β_1	12,3838*	4,16	0,0088	- 1,2527*	-3,80	0,0126
C. dubia	β_0	- 1,6978^{ns}	- 0,51	0,6337	6,9367*	17,94	<0,0001
	β_1	12,3838*	4,16	0,0088	- 4,0582*	- 4,59	0,0101
	β_2				1,2932*	3,23	0,0319

^{ns} = Não significativo pelo teste t de student ($p<0,05$)

*Estatisticamente diferente pelo teste t de student ($p<0,05$)

Tabela 7 -. Parâmetros da regressão estimada para mortalidade (M) de *C. dubia*, *D. magna* e *D. rerio* após a correção do pH.

Organismo	Parâmetros	Estimate (M)	Valor de t	Valor de p	Estimate (pH)	Valor de t	Valor de p
D. rerio	β_0 β_1	- 0,2961^{ns} 0,6983*	- 0,35 4,16	0,7381 0,0089	7,8280* 0,0197*	300,98 3,43	<0,0001 0,0187
D. magna	β_0 β_1	- 3,8428^{ns} 2,6394*	- 1,36 4,16	0,2315 0,0088	NA	NA	NA
C. dubia	β_0 β_1 β_2	1,6378^{ns} - 5,4178* 2,2811*	1,08 - 2,35 4,23	0,3394 0,049 0,0133	NA	NA	NA

^{ns} = Não significativo pelo teste t de student (p<0,05). NA= Modelo de regressão não ajustou
*Estatisticamente diferente pelo teste t de student (p<0,05)

Poucos testes de toxicidade têm sido conduzidos utilizando vinhaça. Em um destes estudos, o crescimento e germinação de *Vigna radiate* foram afetados após exposição a baixas concentrações de vinhaça (KANNAN, 2008) provavelmente pelo fato da alcalinidade do solo e a disponibilidade de manganês serem reduzidas quando a vinhaça está disponível (KUMAR et al., 1997).

Kadioglu e Algur (1990) avaliaram a toxicidade da vinhaça para a ervilha (*Pisum sativum*) e girassol (*Helianthus annuus*), e concluíram que este resíduo foi determinante para o crescimento destas plantas quando expostas a altas concentrações. Estes resultados são diferentes dos encontrados no presente estudo, uma vez que mesmo em baixas concentrações observou-se efeito da vinhaça para os organismos avaliados.

Outros estudos foram realizados avaliando efluentes provenientes da indústria do etanol. Kumar, Sahay e Sinha (1995) avaliaram a toxicidade sobre o peixe *Lebistes reticulatus* e observaram que as mudanças comportamentais apresentaram uma relação positiva com o aumento das concentrações. Kumar e Gopal (2001) observaram mudanças hematológicas no peixe *Channa punctatus* exposto ao efluente da indústria do etanol. Estes mesmo autores

observaram aumento da atividade opercular quando as concentrações aumentaram a partir de 50%, além de natação errática e movimentos rápidos. Condições de hipóxia em peixes são conhecidas por causarem aumento da atividade opercular para compensar a baixa concentração de oxigênio no sangue (SINGH; SINGH, 1979). Matkar e Gangotri (2003) observaram que a toxicidade de efluentes provenientes da indústria do etanol para a espécie de caranguejo *Barythephusa guerini* é dependente da concentração.

De acordo com Wilkie, Riedesel e Owens (2000), o baixo pH da vinhaça altera as propriedades físicas e químicas do solo, rios e lagos produzindo efeitos negativos para a sustentabilidade agrícola, bem como para a biota em geral. Neste mesmo estudo, os autores relatam que antes do seu uso, a vinhaça deveria ser tratada para minimizar os impactos negativos sobre o ambiente.

6.4 Conclusão

Considerando a quantidade gerada e a toxicidade da vinhaça para os organismos aquáticos demonstrados no presente estudo, outros estudos deveriam ser desenvolvidos para melhor entendimento dos seus efeitos e riscos para estes organismos já que ainda há uma literatura bastante escassa contendo essas informações. Muitos métodos para redução da toxicidade da vinhaça podem ser utilizados e devem levar em conta a facilidade do uso, custo benefício e a quantidade de resíduo gerado. O presente estudo mostrou que além de alta toxicidade aguda da vinhaça para os organismos estudados, uma simples correção do seu pH poderia ser utilizado como tratamento pelas indústrias sucroalcooleiras antes de seu uso na fertirrigação para redução de sua toxicidade. No entanto, seria interessante a condução de testes de germinação da cana-de-açúcar após exposição à vinhaça antes da correção do seu pH e após a sua correção para 6,5 com o intuito de saber se a produtividade após a correção é igual ou diferente comparando a antes da correção. Caso a produtividade seja igual, esta idéia poderia ser implantada pelas indústrias.

Referências

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda - Método de ensaio com Daphnia spp (Crustacea - Cladocera).** Rio de Janeiro: ABNT, 2003.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica – Método de ensaio com Ceriodaphnia ssp (Crustácea – Cladocera).** Rio de Janeiro: ABNT, 2005. 12p.

BELTRAN, J.; DOMINGUEZ, J.; PARTIDO, E. Physico-chemical treatment for the depuration of wine distillery wastewaters (vinasse). **Water Science and Technology**, Oxford, v.51, n.1, p.159–166, 2005.

BENITEZ, F.; REAL, F.; ACERO, J.; GARCIA, J.; SANCHEZ, M. Kinetics of ozonation and aerobic biodegradation of wine vinasses in discontinuous and continuous processes. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v.101, n.2, p.203–218, 2003.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONABE). **Acompanhamento de safra brasileira:** cana-de-açúcar, primeiro levantamento, abril/2012. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_04_10_09_19_04_boletim_de_cana.pdf>. Acesso em: 20 ago. 2013.

FERREIRA, L.F.R.; AGUIAR, M.M.; MESSIAS, T.G.; POMPEU, G.B.; LOPEZ, A.M.Q.; SILVA, D.P.; MONTEIRO, R.T. Evaluation of sugar-cane vinasse treated with *Pleurotus sajor-caju* utilizing aquatic organisms as toxicological indicators. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v.74, n.1, p.132-137, 2011.

HAMILTON, M.A.; RUSSO, R.C.; THURSTON, V. Trimmed Spearman-Karber method for estimating medial lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environmental Science and Technology**, Washington, v.7, n.7, p.714-719, 1977.

JIMÉNEZ, A.M.; BORJA, R.; MARTÍN, A.; RAPOSOB, F. Kinetic analysis of the anaerobic digestion of untreated vinasses and vinasses previously treated with *Penicillium decumbens*. **Journal of Environmental Management**, London, v.80, n.4, p.303–310, 2006.

KADIOGLU, A.; ALGUR, O.F. The Effect of vinasse on the growth of *Helianthus annuus* and *Pisum sativun*. Part 1-The effects on some enzymes and chlorophyll and protein content. **Environmental Pollution**, Amsterdam, v.67, n.3, p.223-232, 1990.

KANNAN, A.; UPRETI, R.K. Influence of distillery effluent on germination and growth of mung bean (*Vigna radiata*) seeds. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v.153, n.1-2, p.609-615, 2008.

KUMAR, S.; SAHAY, S.S.; SINHA, M.K. Bioassay of distillery effluent on Common Guppy, *Lebistes reticulates* (Peter). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v.54, n.2, p.309–316, 1995.

KUMAR, V.; WATI, L.; FITZGIBBON, F.; NIGAN, P.; BANAT, I.M.; SINGH, D.; MARCHANT, R. Bioremediation and decolorization of anaerobically digested distillery spent wash. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v.19, n.4, p.311–313, 1997.

KUMAR, V.; WATI, L.; NIGAM, P.; BANAT, I.M.; YADAV, B.S.; SINGH, D.; MARCHANT, R. Decolorization and biodegradation of anaerobically digested sugarcane molasses spent wash effluent from biomethanation plants by white-rot fungi. **Process Biochemistry**, Barking, v.33, n.1, p.83–88, 1998.

KUMAR, S.; GOPAL, K. Impact of distillery effluent on physiological consequences in the freshwater teleost *Channa punctatus*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v.66, n.5, p.617–622, 2001.

LELE, S.S.; RAJADHYAKSHA, P.J.; JOSHI, J.B. Effluent treatment for alcohol distillery: termal pretreatment with energy recovery. **Environmental Progress & Sustainable Energy**, Hoboken, v.8, n.4, p.245-252, 1989.

MANE, J.D.; MODI, S.; NAGAWADE, S.; PHADNIS, S.P.; BHANDARI, V.M. Treatment of spent wash using chemically modifed bagasse and colour removal studies. **Bioresource Technology**, Barking, v.97, n.14, p.1752–1755, 2006.

MATKAR, L.S.; GANGOTRI, M.S. Acute toxicity tests of sugar industrial effluents on the freshwater crab, *Barytelphusa guerini* (H. Milne Edwards) (Decapoda, Potamidea). **Pollution Research,** New Delhi, **v.** 22: 269–276, 2003.

MOHANA, S.; ACHARYA, B.K.; MADAMWAR, D. Distillery spent wash: treatment technologies and potential applications. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v.163, n.1, p.12–25, 2009.

NAIK, N.M.; JAGADEESH, K.S.; ALAGAWADI, A.R. Microbial decolorization of spent wash: A review. **Indian Journal of Microbiology**, New Delhi, v.48, n.1, p.41–48, 2008

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Guideline 203 for testing of chemicals:** fish, acute toxicity test; effects on biotic systems. Paris: OECD, 1992. 9p.

PANT, D.; ADHOLEYA, A. Enhanced production of ligninolytic enzymes and decolorization of molasses distillery wastewaster by fungi under state fermentation. **Biodegradation**, Dorcdrecht, v.18, n.5, p.647–659, 2007.

PARNAUDEAU, V.; CONDOM, N.; OLIVER, R.; CAZEVIEILLE, P.; RECOUS, S. Vinasse organic matter quality and mineralization potential, as influenced by raw material, fermentation and concentration processes. **Bioresource Technology**, Barking, v.99, n.6, p.1553–1562, 2008.

SINGH, S.R.; SINGH, B.R. Changes in oxygen consumption of Siluroid fish *Mystyus vittatus* put to different concentrations of some heavy metal salts. **Indian Journal of Experimental Biology**, New Delhi, v.17, p.274–276, 1979.

WILKIE, A.C.; RIEDESEL, K.J.; OWENS, J.M. Stillage treated characterization and anaerobit treatment of ethanol stillage from conventional and cellulosic feedstocks. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v.19, n.2, p.63-102, 2000.

7. CONCLUSÕES GERAIS

- Parâmetros físicos e químicos (condutividade e demanda bioquímica de oxigênio) demonstraram baixa qualidade da água do rio Piracicaba em locais próximos a Americana e Piracicaba.
- Efeitos sobre a reprodução dos microcrustaceos foram observados em fevereiro e março de 2011 e janeiro de 2012 (meses com alta precicipatação) e ocorreram em amostras de água coletadas próximas a Americana e Piracicaba.
- Alterações histopatológicas nas brânquias de *Danio rerio* após exposição à água do rio Piracicaba foram evidenciadas, no entanto, somente amostras de água coletada nos meses de fevereiro, setembro e outubro em alguns pontos apresentaram diferença significativa.
- Recomendamos o uso de espécies nativas para realização de avaliação da qualidade da água já que os resultados representam melhor a realidade do local.
- Valores de clorofila *a* determinados na água do rio Piracicaba estiveram abaixo do estabelecido na lesgislação ambiental brasileira.
- Baixos valores de IET baseado na clorofila *a* foram determinados nas águas do rio Piracicaba.
- Apesar da determinação debaixos valores de IET não siginifica que o rio Piracicaba não esteja eutrofizado já que a inibição do crescimento das algas por poluentes e o volume de água podem ter mascarados os resultados. Neste sentido recomenda-se a determinação de outros compenentes tais como o fósforo e nitrogênio em rios com influência industrial e agrícola.
- O método cromatográfico para análise de atrazina e ametrina em água mostrou ser linear, sensível, exato e preciso para determinação destas duas moléculas.
- Concentrações de atrazina e ametrina na água do rio Piracicaba variaram de 0,11 a 1,92 µg L^{-1} e 0,25 a 1,44 µg L^{-1}, respectivamente e apresentaram potencial mutagênico e genotóxico para o peixe *D. rerio*.
- A vinhaça possui alta toxicidade aguda para organismos aquáticos, podendo esta ser reduzida após a correção de seu pH para 6,5.