

Universidade de São Paulo

Relatório Final

“Análise Ecotoxicológica do composto Bisfenol A (BPA) e das águas da bacia do Rio Paraíba do Sul, região do médio Paraíba”

Protocolo: 236/2015 IB-USP (Comitê de Ética para Experimentação com Animais) –
autorização para uso dos peixes *Poecilia reticulata* e *Danio rerio*

Edital de propostas para execução de estudos e projetos de pesquisas, em conformidade com o Comitê Médio Paraíba do Sul, Região Hidrográfica III, de acordo com a Resolução CBH-MPS nº 29 de 16 de Julho de 2013 - Plano de Aplicação Plurianual do CBH-MPS.

Aluna: Larissa Yuri Ikeda

Proponente: Prof^a. Dr^a. Teresa Cristina Brazil de Paiva

Lorena

2017

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	3
2. OBJETIVO.....	5
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	5
3.1 Área de estudo.....	5
3.2 Análises Ecotoxicológicas.....	6
3.3 Cultivo de organismos.....	6
3.4 Teste de sensibilidade e carta controle.....	7
3.5 Análise de CL50-48h (BPA) – <i>Danio rerio</i> e <i>Poecilia reticulata</i>	8
3.6 Análise de EC50-48h (BPA) – <i>Daphnia similis</i>	8
3.7 Análises físicas e químicas.....	9
3.8 Análises de dados.....	11
4. RESULTADOS.....	11
4.1 Cultivo dos organismos.....	11
4.2 Análises físicas e químicas das águas dos corpos hídricos.....	12
4.3 Análises Ecotoxicológicas.....	13
4.3.1 Teste de sensibilidade com o dicromato de potássio (peixes).....	13
4.3.2 Teste de sensibilidade ao cloreto de sódio – <i>Daphnia similis</i>	14
4.3.3 Análise de CE50-48h e CL50-48h para Bisfenol A.....	14
4.3.4 Testes ecotoxicológicos: Água bruta do Rio Pirapetinga (RP) e do Córrego Goiabal (CG).....	15
4.3.5 Análise dos componentes principais (ACP).....	15
5. DISCUSSÃO.....	16
5.1 Testes ecotoxicológicos com BPA.....	16
5.2 Análise do BPA no Rio Pirapetinga e no Córrego Goiabal.....	17
5.3 Análise estatística (ACP).....	18
6. CONCLUSÃO.....	18
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	19

1. INTRODUÇÃO

A água é fonte de vida. É indiscutível a importância que essa substância tem para a sociedade, seja como componente bioquímico dos seres vivos, meio de sobrevivência destes ou produto de consumo. Desde o início da civilização, o homem buscou se estabelecer em locais próximos de rios e lagos, onde a cultura de animais e alimentos de subsistência era favorecida.

Após o período da Revolução Industrial, grande parte desse recurso natural tem sido poluído e contaminado. Muitos dejetos e efluentes sem tratamento têm sido eliminados por indústrias, afetando o ecossistema local e, conseqüentemente, o homem. A contaminação atua como um disruptor ambiental, que está ligada à redução/fragmentação do habitat e a perda da sua qualidade, causando diminuição na densidade e na viabilidade das populações e alterações nos padrões de dispersão entre habitats vizinhos (Ribeiro e Lopes, 2013; Wilson e Hopkins, 2013).

Enquanto as investigações da qualidade da água têm tradicionalmente focado em nutrientes, bactérias, metais pesados e poluentes prioritários, pesquisas recentes vêm revelando a ocorrência de centenas de contaminantes orgânicos nos efluentes que estão impactando as águas superficiais urbanas. A significância toxicológica é difícil de avaliar e, geralmente, as concentrações limites aceitáveis para água potável e para efluentes ainda não foram estabelecidas. Coletivamente, esses compostos são referenciados como “Contaminantes Orgânicos Emergentes” (Pal *et al*, 2014).

Um desses contaminantes é o Bisfenol A (BPA). Ele é um composto que tem sido largamente utilizado nas indústrias químicas na produção de resinas epóxi e poliéster estireno. Alguns estudos vêm mostrando que o BPA é potencialmente tóxico para embriões e tem sido apontado como causador de defeitos genéticos. O BPA é um xenoestrogênio não esteroide que exibe aproximadamente 10^{-4} da atividade do estradiol. São poucos os estudos que tem examinado os efeitos do BPA nas espécies da vida selvagem tanto no laboratório como em ensaios de campo (Bindhumol *et al*, 2003; Witorsch, 2002, Flint *et al*, 2012, Wang *et al*, 2015).

Para análise da influência deste e de uma gama de outros compostos em relação ao potencial tóxico de cada um, são realizados ensaios toxicológicos com organismos-testes padronizados, a fim de se observar alguns parâmetros biológicos, como mortalidade, crescimento, reprodução, comportamento dos organismos, dentre outros (Zagatto *et al*. 2008).

A toxicidade em ambientes naturais é objeto de estudo da ecotoxicologia, que junto aos órgãos ambientais, procuram criar e supervisionar leis para o tratamento de efluentes e seu destino correto. Dessa forma, evita-se o desequilíbrio do ecossistema, preservando a qualidade da água e possibilitando a continuidade da vida em todos os níveis tróficos nos corpos hídricos.

O composto BPA apresenta carência de estudos na literatura, tanto em relação à sua presença nos corpos hídricos, quanto à sua toxicidade em relação aos organismos aquáticos, havendo a necessidade de análises específicas sobre diferentes táxons representativos da cadeia alimentar.

No Brasil, especificamente na região sudeste, encontra-se uma das bacias mais importantes do país, no sentido de desenvolvimento econômico, a bacia do Rio Paraíba do Sul. Ela abrange uma área total de aproximadamente 62.074 km², estendendo-se pelos estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais, onde abrange um total de 184 municípios. As águas dessa bacia são utilizadas principalmente para o abastecimento, diluição de esgotos, irrigação e geração de energia elétrica e, em menor escala, destinadas à pesca, aquicultura, recreação e navegação (CEIVAP, 2015).

Diversos fatores contribuem para a degradação da qualidade das águas do Rio Paraíba do Sul, dentre esses o lançamento de cerca de 1 bilhão de litros de esgoto doméstico diariamente nos rios da bacia (CEIVAP, 2015; Amorin & Ferreira, 2000).

Justifica-se o presente estudo pela ausência de dados com enfoque na detecção de BPA no rio Paraíba do Sul, e, tendo em vista a necessidade do entendimento de como este composto influencia em determinados padrões ecológicos da biota aquática, o presente estudo avaliará a influência do mesmo sobre dois vertebrados - *Danio rerio* (Hamilton-Buchanan, 1822), organismo exótico, da região sudeste do Himalaia, *Poecilia reticulata* (Peters, 1859), organismo endêmico da América do Sul (também encontrado no Rio Paraíba do sul), e um invertebrado, *Daphnia similis* claus (1876). Serão estudadas as concentrações que podem interferir nos padrões de sobrevivência e possibilidade de declínio de tais organismos no ambiente natural.

As três espécies foram selecionadas por serem largamente utilizadas para análises de toxicidade, em função da facilidade de manutenção em laboratório, alta sensibilidade e baixo custo (Alsop & Wood, 2011; Scarlett *et al*, 2013; Moreira *et al*, 2010; Pelli & Connaughton, 2015; Liguoro *et al*, 2012; Rodgher & Espindola, 2010).

2. OBJETIVOS

Análise do composto BPA na bacia do Rio Paraíba do Sul e de sua toxicidade sobre os organismos *P. reticulata*, *D. rerio* e *D. similis*.

Específicos

- Análise qualitativa e quantitativa de BPA em dois afluentes do Rio Paraíba do Sul (Rio Pirapetinga e Córrego Goiabal)
- Análise ecotoxicológica da água bruta dos dois afluentes mencionados (sem diluição) com os organismos-teste.
- Análise ecotoxicológica do composto BPA (CL50-48h / EC50-48h) sobre os organismos *Poecilia reticulata*, *Danio rerio* e *Daphnia similis*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Área de estudo

Os pontos de amostragem escolhidos situam-se em afluentes do Rio Paraíba do Sul, no Rio Pirapetinga e no Córrego Goiabal, no Estado do Rio de Janeiro, nos quais existem fábricas que lançam seus efluentes nas águas do corpo hídrico em questão. Em cada área indicada no mapa (figura 1) foram selecionados dois pontos de coleta.

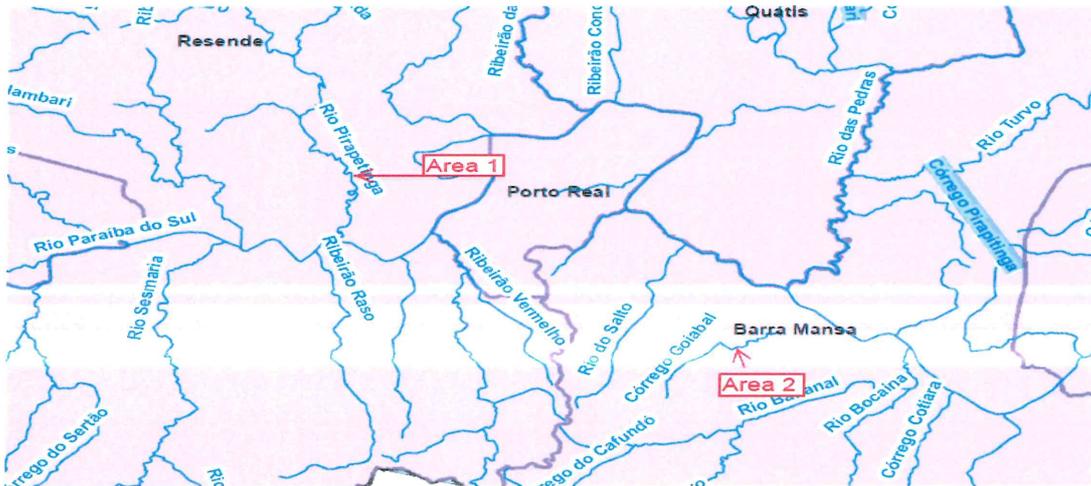


Figura 1- Locais onde serão coletadas amostras na Região do Médio Paraíba

Foram realizadas duas coletas anuais, uma em abril de 2016 e outra em dezembro de 2016, segundo a base de dados do núcleo de monitoramento agroclimático (ESALQ-USP), avaliando a interferência das chuvas em relação aos parâmetros avaliados. Foram coletados 4 litros de amostra em cada ponto, sendo transferidos para

frascos âmbar e armazenados na presença de bolsas de gelo até o retorno para o laboratório.

3.2 Análises Ecotoxicológicas

Os cultivos e ensaios ecotoxicológicos dos organismos foram baseados nas referências presentes na tabela 1.

Tabela 1 – Referências dos testes ecotoxicológicos

Organismo	Referência
<i>D. rerio</i>	ABNT 15088:2011
<i>P. reticulata</i>	ABNT 15088:2011 (adaptada por ARAÚJO, 2008)
<i>D. similis</i>	ABNT 12713:2009

3.3 Cultivo dos organismos

Os organismos *P. reticulata* e *D. rerio* foram obtidos na Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios de Pindamonhangaba/SP e na empresa Power Fish (Rio de Janeiro-RJ), respectivamente, passando ambos por aclimação no laboratório de Ecotoxicologia da Escola de Engenharia de Lorena (EEL-USP) antes dos ensaios (figura 2). O laboratório de Ecotoxicologia da EEL já possuía cultivos do microcrustáceo *Daphnia similis*.



Figura 2- Laboratório de adaptação e cultivo de peixes

A água de cultivo foi obtida de um poço artesiano localizado no mesmo campus (EEL-USP), sendo com carvão ativado, obtendo pH e condutividade próximos a 7 e 140 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$, respectivamente.

Foram realizados ensaios de Dureza (CETESB, 1978), Amônio (Koroleff, 1976) e Oxigênio Dissolvido (CETESB, 1978), além das leituras de pH e Condutividade com sonda Hanna modelo HI 9811-5 calibrada semanalmente.

3.4 Testes de sensibilidade e carta controle

A substância Dicromato de Potássio ($K_2Cr_2O_7$) (figura 3) foi utilizada como substância referência para a avaliação da sensibilidade dos organismos *P. reticulata* e *D. rerio*, sendo escolhida por ser um contaminante ambiental, solúvel em água, altamente tóxica na água e legalmente utilizada como substância referência em vários países (Environment Canada, 1990). Foram utilizados cristalizadores de vidro com capacidade de 1.2 litros contendo amostras diluídas do composto, respeitando um gradiente linear de concentração. Em cada tratamento ($n=3$) foram inseridos 5 peixes, totalizando 30 organismos expostos por réplica. Baseado em análises/dados preliminares, foram estipuladas as seguintes concentrações para serem empregadas nos testes de sensibilidade: controle, 10 mg.L^{-1} , 50 mg.L^{-1} , 100 mg.L^{-1} , 150 mg.L^{-1} , 300 mg.L^{-1} . Durante todos os experimentos os tratamentos foram aerados por um compressor com difusores, de forma a manter a concentração de oxigênio dissolvido $> 6\text{ mg.L}^{-1}$.

O cloreto de sódio (NaCl) (faixa de concentração de 1 mg.L^{-1} a 10 mg.L^{-1}) foi escolhido para aplicação nos testes de sensibilidade com *D. similis* (figura 4), uma vez que esse composto já era aplicado no laboratório de forma rotineira para o organismo em questão.



Figura 3- Teste com Dicromato de Potássio – preparação da solução e inserção dos peixes

Nos testes com os peixes *P. reticulata* e *D. rerio* foram calculados os valores médios do CL50-48h (concentração que mata/imobiliza 50% dos organismos testados). Os dados obtidos foram comparados com dados da literatura. Nos testes com o organismo *D. similis*, foram calculados os valores médios do CE50-48h (concentração efetiva que causa efeito em 50% dos organismos testados), sendo os valores comparados com os provenientes da carta controle (control chart) produzida pelo próprio laboratório onde os organismos foram cultivados (ABNT, 2011).



Figura 4 - Teste com Cloreto de Sódio – preparação da solução e inserção dos microcrustáceos

3.5 Análise de CL50-48h (BPA) - *D. rerio* e *P. reticulata*

Foram utilizados cristalizadores de vidro com capacidade de 1,2 litros contendo amostras diluídas do composto, respeitando um gradiente linear de concentração. Em cada tratamento (n=3) foram inseridos 5 peixes, totalizando 30 organismos expostos por réplica. A faixa de concentração adotada foi de 1 mg.L⁻¹ a 40 mg.L⁻¹. Durante todos os experimentos os tratamentos foram aerados por um compressor com difusores, de forma a manter a concentração de oxigênio dissolvido > 6 mg.L⁻¹.

3.6 Análise de CE50-48h (BPA) - *Daphnia similis*

Foram utilizados recipientes de plástico com capacidade de 50 ml contendo amostras diluídas do composto (5 diluições), respeitando o gradiente linear de concentração, contendo 5 organismos cada (n=4). A faixa de concentração adotada foi de 1 mg.L⁻¹ a 20 mg.L⁻¹.

3.7 Análises físicas e químicas

A tabela 1 apresenta os parâmetros que foram analisados nas águas do Rio Pirapetinga, Córrego Goiabal e nas águas de cultivo dos organismos-teste.

Tabela 1 - Variáveis e métodos utilizados na caracterização física e química da qualidade das águas do Rio Pirapetinga, Córrego Goiabal e dos aquários (cultivos).

Variável	Metodologia	Referência
*Bisfenol A	Cromatografia	Dussalt <i>et al.</i> (2009)
Ph, temperatura e condutividade	Sonda Hanna Instruments HI 9811-5	-
Oxigênio dissolvido	Método Winkler modificado pela azida sódica	Norma Técnica L5.169 - CETESB
Amônio (somente para os aquários)	Espectrofotometria	Koroleff (1976)
Dureza (somente para os aquários)	Método da titulação com EDTA	Norma técnica L5.124 - CETESB
Sólidos totais	Gravimétrico	-
Clorofila a (somente para os aquários)	Método da acetona	Lorenzen (1967)
**Na ⁺ , K ⁺ , NO ₃ ⁻ e PO ₄ ⁻ (somente para os aquários)	Absorção atômica	APHA, 2012

* Filtração, extração e eluição das amostras (Bisphenol)

As amostras coletadas das águas dos afluentes foram filtradas em laboratório em membrana de fibra de vidro, de porosidade 1,2 µm, para a retirada de sólidos em suspensão. Em seguida, 500 mL de cada amostra filtrada foi percolada através de cartuchos OasisHLB com ajuda de uma bomba peristáltica, com uma vazão de 7 mL min⁻¹ para a extração dos analitos de interesse (figura 5). O sistema para a extração foi o mesmo desenvolvido por Sodré *et al.* (2010).



Figura 5 – Sistema de extração dos analitos

A quantificação dos compostos alvo foi realizada por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS). Foi utilizado um

cromatógrafo Agilent modelo 1200, equipado com bomba binária, injetor automático e compartimento de coluna termostatizado. A separação cromatográfica foi realizada com uma coluna Zorbax SB-C18 (2,1x30 mm, tamanho de partícula de 3,5 µm) a 25°C. A fase móvel foi constituída de água ultrapura (A) e metanol (B), previamente filtrados em membranas com 0,2 µm de porosidade, contendo 0,01 % de hidróxido de amônio, aditivo esse que favorece a formação de íons. A composição do gradiente, em função da concentração do solvente B, foi a seguinte: início com 68 % e aumento para 80 % em 3 minutos. Entre cada corrida cromatográfica o sistema foi mantido a 68 % de B por 5 minutos para acondicionamento da coluna. A identificação e a quantificação dos compostos foram realizadas por espectrometria de massas em um equipamento Agilent com triplo quadrupolo (modelo 6410B). Os compostos foram ionizados em uma fonte de *electrospray* no modo negativo, e foram monitorados pelo modo MRM (*MultipleReactionMonitoring*), de acordo com os parâmetros descritos na tabela 2. Os parâmetros da fonte de ionização foram os seguintes: temperatura de 325 °C, o fluxo do gás de secagem de 10 litros por minuto, a pressão de nebulizador foi de 50 psi e a tensão no capilar de íons de 4000 V. As curvas analíticas foram construídas de acordo com a área obtida para cada composto em função de sua massa na coluna.

Tabela 2 – Transições precursor-produto e as respectivas energias de colisão (EC) selecionadas para a quantificação do BPA empregando o modo MRM do espectrômetro de massas.

Composto	Polaridade	Fragmentor (V)	Precursor	Quantificação		Confirmação 1	
			(m/z)	m/z	EC (V)	m/z	EC (V)
Bisfenol A	-	100	227	210,9	30	132,9	25

*m/z ± 0,1

** *Análise dos elementos Na⁺, K⁺, NO₃⁻ e PO₄⁻ - Absorção atômica*

As amostras de água de aquário foram pré-tratadas pelo processo de filtração (filtro 0,45 µm) segundo a metodologia 3030B para caracterização de cátions dissolvidos como sódio, potássio e ânions dissolvidos como nitratos e fosfatos. Para as análises de cátions foram utilizado um fotômetro de chama da marca Analyser, com limites de detecção em 0,5 mg.L⁻¹ para potássio e o sódio ($R_K^2=0,997$ e $R_{Na}^2 = 0,994$). Para as análises de nitratos e fosfatos foram usados os métodos espectroscópicos de absorvância, para nitratos usou-se a análise direta em 220 nm ($R_{NO_3}^2= 0,989$), por que a amostra apresentou baixo teor de matéria orgânica, e para os fosfatos utilizou-se o

método colorimétrico fosfato vanadomolibdato em 470 nm ($R_{PO_4^2}=0,995$), ambos usando um espectrofotômetro UV-vis da marca Shimadzu (UV-1800).

3.8 Análise de dados

A CL50-48h e CE50-48h foram determinadas através da utilização do programa Spearman-Kärber, versão 1.5[®] com a ferramenta estatística Trimmed Spearman-Kärber, na qual foi analisada a concentração de BPA que matou/imobilizou 50% dos organismos-teste em cada tratamento. Para a água bruta dos afluentes, sem diluição, foi utilizado o programa Toxstat[®], e a análise Fisher Exact Test (mortalidade).

Os dados dos parâmetros físicos e químicos foram analisados através da Análise de Componentes Principais (ACP), a fim de averiguar as correlações existentes entre os parâmetros e as estações de coleta, através do programa estatístico PAST[®]. Foi possível analisar também a influência das estações seca e chuvosa sobre os parâmetros estudados.

4. RESULTADOS

4.1 Cultivo dos organismos

Os dados referentes às análises realizadas diretamente na água dos aquários e cristalizadores são apresentados na tabela 3 (média, desvio padrão) para todo o período de cultivo dos organismos.

Tabela 3 – Parâmetros analisados na água de cultivo: pH (potencial hidrogeniônico), Cond (condutividade), OD (Oxigênio Dissolvido), Clo a (clorofila a), Dureza, Amônio (NH_4^+), Nitrato (NO_3^-) e Fosfato (PO_4^-).

Organismo	pH	Cond ($\mu S/cm$)	OD ($mg.L^{-1}$)	Clo a ($mg.L^{-1}$)	Dureza ($mg.L^{-1}$)	Amônio $mg.L^{-1}$	NO_3^- $mg.L^{-1}$	PO_4^- $mg.L^{-1}$
<i>P. reticulata</i>								
Média	7,2	120	6,5	<L.D.	40	0,03	0,90	1,2
DP	0,8	30	1,2	<L.D.	20	0,02	0,2	0,3
<i>D. rerio</i>								
Média	7,5	120	6,0	<L.D.	40	0,05	0,90	1,2
DP	0,5	40	0,3	<L.D.	10	0,02	0,2	0,3
<i>D. similis</i>								
Média	7,0	200	7,2	<L.D.	50	<L.D.	-	-
DP	0,2	30	0,5	<L.D.	10	<L.D.	-	-

O pH ideal para o cultivo de peixes se encontra entre 6,5 e 7,5, e a temperatura ideal entre 23 e 28°C. A condutividade medida encontra-se dentro dos limites previstos em cultivos (60 a $500 \mu S.cm^{-1}$). A elevação dos seus níveis pode estar associada ao

aumento da matéria orgânica na água, contribuindo para o acúmulo de íons no ambiente de cultivo (Ituassu *et al.*, 2004). Os níveis de oxigênio dissolvido se encontram dentro do estipulado pela CONAMA 357 (2005) para manutenção da vida aquática ($> 6 \text{ mg.L}^{-1}$). A dureza média da água dos aquários pode ser descrita como macia ($0\text{-}60 \text{ mg.L}^{-1} \text{ CaCO}_3$), uma característica de águas subterrâneas.

Quanto à Clorofila a, não foi possível quantificar a concentração. Alguns fatores limitantes são necessários para que as algas se desenvolvam, como fontes de N (nitrogênio) e P (fósforo). Como as águas dos aquários eram renovadas (30%) semanalmente, possivelmente não havia tempo hábil para que tais microrganismos se desenvolvessem, pois as condições não eram favoráveis para isso (ausência de fatores necessários em concentrações ideais).

Não foi detectada a presença dos cátions Na^+ e K^+ . As concentrações dos ânions NO_3^- PO_4^- , não pode ultrapassar os 50 mg.L^{-1} (Aquaset, 2013) e $0,03 \text{ mg.L}^{-1}$ (Reefsimples, 2009), respectivamente. A concentração de fosfato se encontrou 40 vezes acima do recomendado para aquarismo, mas, ainda assim, não foi observada mortalidade dos peixes durante todo o período de cultivo.

4.2 Análises físicas e químicas das águas dos corpos hídricos

Os dados das análises físicas e químicas realizadas nas águas do Rio Pirapetinga e no Córrego Goiabal são apresentados na tabela 4 (média, desvio padrão) para ambas as estações de coleta (seca e chuvosa).

Tabela 4 - Parâmetros analisados na água bruta do Rio Pirapetinga (RP) e Córrego Goiabal (CG): pH (potencial hidrogeniônico), Cond (condutividade), ST (sólidos totais), °C (temperatura), OD (Oxigênio Dissolvido) e BPA (Bisfenol A).

Rio/ Estação	pH	Cond ($\mu\text{S/cm}$)	ST	°C (mg.L^{-1})	OD (mg.L^{-1})	BPA (ng.L^{-1})
RP						
<i>Seca</i>	7,3	96,7	89,2	21,6	6,0	45,2
<i>Chuvosa</i>	7,1	141,7	130	25,2	6,7	23,4
DP	0,14	31,81	28,85	2,54	0,49	15,41
CG						
<i>Seca</i>	6,9	125	116,7	21,8	6,7	<L.Q.
<i>Chuvosa</i>	6,8	245	138,3	27,2	6,6	20,4
DP	0,07	84,85	15,27	3,81	0,07	-

4.3 Análises Ecotoxicológicas

4.3.1 Teste de sensibilidade com dicromato de potássio (peixes)

Os resultados dos testes de sensibilidade ao composto dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) para os organismos *P. reticulata* e *D. rerio* são apresentados nas tabelas 4 e 5, respectivamente.

Tabela 4 - Valores de CL_{50} 48h ($mg.L^{-1} K_2Cr_2O_7$) obtidos nos testes de sensibilidade para o organismo *Poecilia reticulata*

Teste com Dicromato de Potássio	CL_{50} -48h ($mg.L^{-1}$)
1	56,00
2	22,36
3	46,62
Média	41,66
Desvio padrão	14,17

Os valores da CL_{50} -48h obtidos para o teste de sensibilidade com o dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) utilizando o organismo *P. reticulata*, variaram entre 22,36 $mg.L^{-1}$ e 56,00 $mg.L^{-1}$ (70,00-13,23). Cannavan (2009) obteve um valor de CL_{50} -24h de 50 $mg.L^{-1}$. Mesmo sendo um teste mais curto, os valores são similares.

Tabela 5 - Valores de CL_{50} 48h ($mg K_2Cr_2O_7.L^{-1}$) obtidos nos testes de sensibilidade para o organismo *Danio rerio*.

Teste com Dicromato de Potássio	CL_{50} -48h ($mg.L^{-1}$)	Intervalo de confiança (95 %) ($mg.L^{-1}$)
1	110,14 *	60,14 – 140,8
2	148,55 *	143,47 – 188,39
3	123,21 *	24,02 – 171,89
Média		127,3
Desvio padrão		19,53

Nos ensaios de sensibilidade com o organismo *D. rerio*, obteve-se uma concentração mediana de CL_{50} 48h de aproximadamente 127,3 $mg.L^{-1}$, valor muito próximo do reportado pela literatura segundo Tavares (2008) e Silva *et al.* (2010), em que os valores médio obtidos foram 151,06 $mg.L^{-1}$ e 114 $mg.L^{-1}$, respectivamente.

Cabe aqui ressaltar, que os comitês nacionais e internacionais tem proibido a utilização de um quantitativo elevado de organismos em bioensaios, especialmente vertebrados. Dessa forma, as cartas controle tem se tornado obsoletas, uma vez que obriga o pesquisador a realizar dezenas de ensaios e sacrificar um número significativo de organismos. Dessa forma, o que tem se visto em artigos internacionais em revistas importantes, como a *Chemosphere*, é a realização de 3 ensaios (n=3) de sensibilidade e comparação com os dados de outros trabalhos já publicados, reduzindo assim o quantitativo de organismos necessários. Outro fator importante, é o de que para ensaios como o do atual relatório, há a necessidade de cadastramento no comitê de ética para experimentação animal, descrevendo o número de cobaias a serem utilizadas e o período do projeto.

4.3.2 Teste de sensibilidade ao Cloreto de Sódio - *Daphnia similis*

Pela análise da carta-controlê (figura 6) do organismo *D. similis*, observa-se que a EC₅₀ 24 h média encontrada na exposição ao composto NaCl foi de 2,71 mg.L⁻¹, com intervalo de 2,32 a 3,10 mg.L⁻¹. Como o valor se encontra dentro dos limites estabelecidos, o organismo *D. similis* se demonstrou apto para ser utilizado nos testes ecotoxicológicos (baseados na carta controle presente no laboratório de ecotoxicologia da EEL-USP).

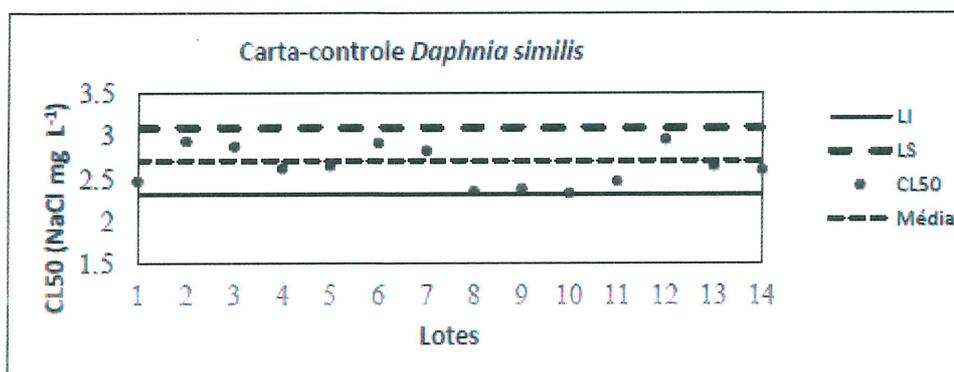


Figura 6 – Carta controle produzida no laboratório de ecotoxicologia da EEL-USP para o organismo *D. similis*.

4.3.3 Análise de CL50-48h e CE50-48h para BPA

Os dados dos efeitos tóxicos do composto BPA para as três espécies de bioindicadores são descritos na tabela 6. Observa-se que o organismo mais sensível ao composto é o peixe *P. reticulata*, e o menos sensível o microcrustáceo *D. Similis*.

Tabela 6 - Valores de CL₅₀ 48h (BPA) obtidos nos testes ecotoxicológicos para os organismos *P. reticulata*, *D. rerio* e *D. similis*.

Organismo	CL50 / CE50	Limites
<i>Poecilia reticulata</i>	2,2 mg.L ⁻¹	1,1-4,4
<i>Danio rerio</i>	10 mg.L ⁻¹	8-12
<i>Daphnia similis</i>	12,64 mg.L ⁻¹	9,3-17,17

4.3.4 Testes ecotoxicológicos: Água bruta do Rio Pirapetinga (RP) e do Córrego Goiabal (CG)

O Fisher exact test ao final da análise dos dados gera um valor estatístico crítico, indicando para significância (tóxico) ou não (não tóxico). Valores maiores do que o crítico eram considerados como não significantes (não tóxicos). O valor crítico gerado pelas análises foi de 15, e cada tratamento obteve um valor estatístico de 20, ou seja, não houve significância comparando o quantitativo de mortos de cada tratamento com o controle (nenhuma amostras foi considerada tóxica).

4.3.5 Análise dos componentes principais (ACP)

Na figura 7, na análise dos componentes principais baseados numa matriz de correlações, o eixo 1 explicou 59,53% do arranjo da variância, e em conjunto com o eixo 2 explicou aproximadamente 83,4%.

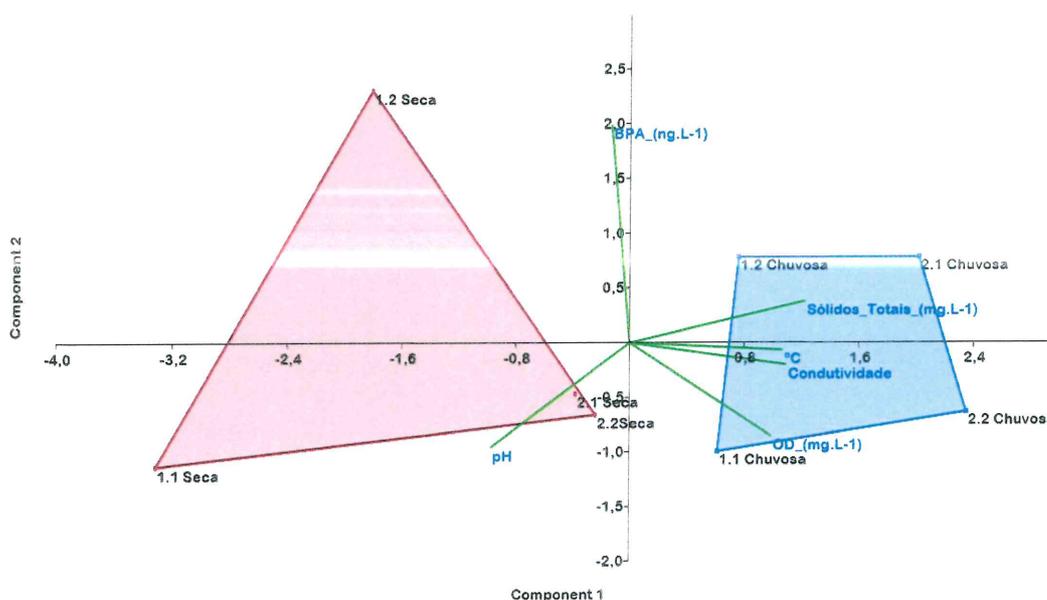


Figura 7 - Ordenação com base na Análise dos Componentes Principais (ACP) de Correlação de variáveis limnológicas em duas estações; seca (abril/2016) e chuvosa (dezembro/2016). As variáveis analisadas foram agrupadas por área (1 - RP e 2 - CG) e estação (seca e chuvosa).

Dois grupos distintos se formaram entre RP e CG, estação seca (esquerda) e estação chuvosa (direita), distinguindo assim diferenças estatísticas entre ambos os períodos. A análise demonstrou haver diferenças estatísticas que predizem a influência das chuvas em ambos os corpos hídricos. O vetor do parâmetro BPA apresentou uma pequena inclinação para a estação seca.

Os parâmetros Sólidos totais, Condutividade, Temperatura e Oxigênio Dissolvido demonstraram apresentar maior correlação com a estação chuvosa, uma vez que se agruparam próximos do grupo correspondente a essa estação.

5. DISCUSSÃO

5.1 Testes ecotoxicológicos com BPA

Segundo a literatura, os valores da concentração letal de BPA a organismos aquáticos variam de 1 a 20 mg.L⁻¹ (Staples *et al.*, 1998; Staples *et al.*, 2002). No presente trabalho foram encontrados para os organismos *P. reticulata*, *D. rerio* e *D. similis* valores de CL50/EC50 dentro da faixa esperada (2,2 – 12,64 mg.L⁻¹).

O lançamento de BPA no ambiente aquático deve-se quase que exclusivamente ao lançamento direto de efluentes. Pequenas quantidades lançadas são originárias de efluentes de estações de tratamento de águas residuárias que são capazes de remover entre 90 e 98% do composto em questão (Nakada *et al.*, 2006; Drewes *et al.*, 2005). O compartimento aquático tem sido identificado como o principal local em que o BPA pode ser encontrado. Diversos trabalhos demonstraram a concentração máxima do composto em corpos hídricos. Verliefe *et al.* (2007) aponta na Holanda para concentrações máximas de 22.000 ng.L⁻¹, ou seja, 0,022 mg.L⁻¹. Esse valor supera em muito (~60%) a concentração máxima encontrada por Montagner & Jardim (2011) no Brasil, que foi de 13.016 ng.L⁻¹ (0,013 mg.L⁻¹).

Comparando a concentração máxima indicada por Verliefe *et al.* (2007), de 0,022 mg.L⁻¹ de BPA nos corpos hídricos, com aquela confirmada pelos testes de toxicidade de 12,64 mg.L⁻¹, vemos que dificilmente ocorreria toxicidade aos organismos aquáticos nas águas dos rios pela presença de BPA nessas baixas concentrações.

Concentrações elevadas de BPA somente ocorreriam em catástrofes ambientais, como um vazamento acidental. Fukazawa *et al.* (2002) mostraram que a concentração de BPA nos efluentes de parques industriais que trabalham com o composto, podem

chegar a centenas de milhares de ng.L^{-1} . Somente nesse caso, com concentrações altas (mg.L^{-1}) poderíamos ter efeitos agudos de toxicidade para os organismos aquáticos.

Mesmo sabendo da importância da análise da concentração letal aos organismos aquáticos (efeito agudo), têm-se dado enfoque em efeitos sub-letais, em baixas concentrações dos poluentes ($\mu\text{g.L}^{-1}$), ou seja, efeitos que interfiram na natalidade, desenvolvimento, metabolismo, deformidades genéticas, comportamentais, etc. (efeitos crônicos).

São vários os estudos que destacam os efeitos sub-letais, com exposições que duram de horas, semanas, até meses. Wang *et al.* (2015) mostraram os efeitos de efluentes tratados (concentrações $< 500 \mu\text{g.L}^{-1}$ de BPA) que causam várias aberrações comportamentais, como baixa adaptabilidade a novos ambientes, natatória comprometida, redução da agressividade, redução do engajamento social e redução das tendências óbvias quanto ao ciclo circadiano, enquanto Song *et al.* (2014), em concentrações menores que $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$, confirmam a hipótese de que o BPA causa lesões nas larvas de *D. rerio* e atrasa a eclosão dos ovos.

5.2 Análise do BPA no Rio Pirapetinga e no Córrego Goiabal

Foram encontrados em ambos os corpos hídricos, RP e CG, concentrações de BPA que variaram de $20,4 \text{ ng.L}^{-1}$ a $45,2 \text{ ng.L}^{-1}$. Comparando esses dados com as análises realizadas por Montagner (2011) no Rio Atibaia, máxima de 11 ng.L^{-1} , os valores chegaram a ser até 4 vezes maiores.

Os efluentes gerados pelas indústrias desde que devidamente caracterizados e que não ofereçam problemas para o tratamento final nas Estações de Tratamentos de Efluente (E.T.Es), tubulações, etc., poderão ser lançados na rede coletora municipal. A bacia dos rios em questão possui inúmeras plantas industriais, como automobilísticas, de papel, embalagens etc., sendo que nos processos de produção de bens de consumo, muitos possuem em sua estrutura o BPA, para a produção de policarbonatos de plástico, resinas epóxi e embalagens plásticas de produtos alimentícios (Schechter *et al.*, 2010; Vandenberg *et al.*, 2007). Sabendo que a eficácia da remoção de BPA não é completa ($\leq 98\%$), e que muitas vezes as indústrias despejam diretamente nos corpos hídricos (com tratamentos muitas vezes duvidosos), o BPA poderá estar sempre presente em bacias como essa, aumentando assim o risco ambiental para espécies suscetíveis aos efeitos crônicos do composto (em baixas concentrações).

5.3 *Análise estatística - ACP*

Na análise dos componentes principais, observou-se a formação de dois grupos distintos para cada rio e o que mais se destacou foi a diferenciação dos parâmetros analisados entre estação seca e chuvosa. Os parâmetros Sólidos Totais, Condutividade, Oxigênio Dissolvido e Temperatura apontaram todos para o grupo da estação chuvosa, ou seja, suas medidas foram maiores nesse período. Podemos dizer que em períodos com maior precipitação há um aumento da concentração de sólidos totais por escoamento superficial ou pelas redes de drenagem, podendo assim aumentar a condutividade elétrica. Como há mais turbulência nas águas devido a maiores vazões, a água pode apresentar maiores concentrações de Oxigênio Dissolvido (Esteves, 1998).

Sendo assim, pela conformação das figuras geométricas no gráfico (grupos) e dos vetores (parâmetros), a estação chuvosa sem dúvida foi a que mais contribuiu para a alteração da qualidade da água. Observa-se que o vetor do BPA manteve-se quase que totalmente sobreposto ao eixo Y, mas com pequena inclinação para o grupo da estação seca, podendo dessa forma assinalar que em épocas de menores vazões as cargas do composto podem ser maiores (menor efeito de diluição).

6. CONCLUSÕES

As análises da concentração do composto BPA no Rio Pirapetinga e Córrego Goiabal indicaram a presença do composto em ambos os corpos hídricos, em concentrações médias parecidas com outras apontadas pela literatura para rios do Brasil e de outros países.

Os resultados dos testes ecotoxicológicos com a água bruta dos afluentes não mostraram toxicidade, sendo assim, podemos averiguar que ambos os corpos hídricos possuem um padrão aceitável de qualidade para a manutenção da vida aquática.

A análise ecotoxicológica do composto BPA sobre os três bioindicadores indicou uma faixa de concentração que causa mortalidade dentro do que mostra a literatura, sendo tais concentrações maiores do que aquelas que ocorrem nas águas superficiais.

Entende-se, que mesmo com os resultados positivos obtidos pela análise da qualidade das águas de ambos os corpos hídricos, há a necessidade da realização de outros ensaios complementares, sub-letais e comportamentais, que poderiam agregar mais valor às análises ecotoxicológicas, estimando assim, de forma mais precisa, o

potencial do risco ambiental da presença de poluentes aquáticos como o BPA, mesmo em baixas concentrações.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. **ABNT 15088:2011**. Toxicidade aguda - Método de ensaio com peixes.

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. **ABNT 12713:2009**. Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia* spp (Crustacea, Cladocera)

ALSOP, D., WOOD, C. M. **Metal uptake and acute toxicity in zebrafish: Common mechanisms across multiple metals**. *Aquatic toxicology* 105 (2011) 385-393.

AMORIN, D. D., FERREIRA, M. E. **Um estudo sobre a qualidade das águas do Rio Paraíba do Sul no Vale do Paraíba do Sul no período de 1978 a 1994**. Resumos do XIII Simpósio Brasileiro de Recursos Hídricos (disponível em CD), Belo Horizonte, MG. 2000.

APHA (2012) **Standard methods for the examination of water and waste water**. American Public Health Association, Washington, DC.

AQUASET. **O que saber sobre pH, amônia, nitrito, nitrato, dureza geral e dureza carbonada**. Acesso em: 31/07/2017

Disponível em: <https://aquaset.wordpress.com/2013/01/18/o-que-saber-sobre-ph-amonia-nitrito-nitrato-dureza-geral-e-dureza-carbonada/>

ARAÚJO, C. V. M. **Discriminating the pH toxicity to *Poecilia reticulata* Peters, 1859 in the Dunas Lake (Camaçari, BA, Brazil)**. *Chemosphere* 73 (2008) 365-370.

BINDHUMOL, V., CHITRA, K.C., MATHUR, P.P., 2003. **Bisphenol A induces reactive oxygen species generation in the liver of male rats**. *Toxicology* 188 (2–3), 117–124.

CANNAVAN, M. C. **Determinação da sensibilidade de *Poecilia reticulata* para o dicromato de potássio através de testes de toxicidade**. *Revista Eletrônica de Biologia (REB)*. ISSN 1983-7682, v. 2, n. 4 (2009)

CEIVAP. COMITÊ DE INTEGRAÇÃO DA BACIA HIDROGRÁFICA DO RIO PARAÍBA DO SUL. **Dados Geoambientais**. Disponível em: <http://www.ceivap.org.br/geoambientais.php>. Acesso em: 20/08/2015.

CETESB. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. **Norma Técnica L5.124 – Determinação de Dureza. Método da titulação com EDTA**. 1978.

CETESB. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. **Norma Técnica L5.169 -**

Determinação de Oxigênio Dissolvido. Método Winkler modificado pela azida sódica. 1978.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. CONAMA. Resolução nº 357, de 17 de Março de 2005. **Dispõem sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências.** Brasília, 2005.

DREWES, J. E., HEMMING J., LADENBURGER, S. J., SCHAUER J., SONZOGNI, W. (2005) Na assessment of endocrine disrupting activity changes during wastewater treatment through the use of bioassays and chemical measurements; *Water Environ. Res.*; 77; p 12.

ENVIRONMENT CANADA. **Report EPS 1/RM/12: guidance document on control of toxicity test precision using reference toxicants.** Ottawa, Ontario, 1990. 85 p.

ESTEVES, F. A. **Fundamentos em Limnologia.** 2ª Edição. Editora Interciência. Rio de Janeiro, 1998. 602p

FLINT, S., MARKLE, T., THOMPSON, S., WALLACE, E. **Bisphenol A exposure, effects, and policy: A wildlife prospective.** *Journal of Environmental Management* 104 (2012) 19-34.

Fukazawa, H., Hoshino, K., Shiozawa, T., Matsushita, H., Terao, Y., 2001. **Identification and quantification of chlorinated bisphenol A in wastewater from wastepaper recycling plants.** *Chemosphere* 44, 973-979.

ITUASSU, D.R.; SANTOS, G.R.S.; ROUBACH, R.; PEREIRA-FILHO, M. **Desenvolvimento de tabaqui submetido a períodos de privação alimentar.** *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 39: 1199-1203. 2004.

Koroleff, F. **Determination of nutrients.** pg. 117-181. In: Grasshoff, K. (ed.) *Methods of seawater analysis.* Verlag Chemie Weinheim, 1976.

LIGUORO, M., LEVA, V., BONA, M. D., MERLANTI, R., CAPORALE, G., RADAELLI, G. **Sublethal effects of trimethoprim on four freshwater organisms.** *Ecotoxicology and Environmental Safety* 82 (2012) 114-121.

MONTAGNER C.C., JARDIM W.F. (2011) Spatial and seasonal variations of pharmaceuticals and endocrine disruptors in the Atibaia River, São Paulo State (Brazil); *J. Braz. Chem. Soc.*; 22; p 1452.

MOREIRA, S. M., MOREIRA-SANTOS, M., RENDÓN-VON, J. O., SILVA, E. M., RIBEIRO, R., GUILHERMINO, L., SOARES, A. M. **Ecotoxicological tools for the**

tropics: Sublethal assays with fish to evaluate edge-of-field pesticide runoff toxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73 (2010) 893–899

NAGEL, S. C., TILLITT, D. E., SAAL, F. S., ROSENFELD, C. S. Effects of the environmental estrogenic contaminants bisphenol A and 17 α -ethinyl estradiol on sexual development and adult behaviors in aquatic wildlife species. *General and Comparative Endocrinology* 214 (2015) 195-219.

NAKADA, N., YASOJIMA, M., OKAYASU, Y., KOMORI, K., TANAKA, H., SUZUKI, Y. (2006) Fate of oestrogenic compounds and identification of oestrogenicity in a wastewater treatment process; *Water Sci. Technol.*;53; p 51.

PAL, A., HE, Y., JEKEL, M., REINHARD, M., GIN, K. Y. Emerging contaminants of public health significance as water quality indicator compounds in the urban water cycle. *Environment international* 71 (2014) 46-62.

PELLI, M., CONNAUGHTON, V. P. Chronic exposure to environmentally-relevant concentrations of fluoxetine (Prozac) decreases survival, increases abnormal behaviors, and delays predator escape responses in guppies. *Chemosphere* 139 (2015) 202-209.

REEFSIMPLES. Fosfato (PO₄) – O veneno do aquário. Acesso: 31/07/2017
Disponível em: <https://reefsimples.wordpress.com/2009/03/30/fosfato-po4-o-veneno-do-aquario/>

RIBEIRO, R., LOPES, I., 2013. Contaminant driven genetic erosion and associated hypotheses on alleles loss, reduced population growth rate and increased susceptibility to future stressors an essay. *Ecotoxicology* 22, 889–899.

RODGHER, S, ESPÍNDOLA, E. L. G. Suitability of *Daphnia similis* as an alternative organism in ecotoxicological test: implications for metal toxicity. *Ecotoxicology* (2010) 19: 1027-1033.

SCARLETT, A. G., REINARDY, H. C., HENRY, T. B. , WEST, C. E. , FRANK, R. A., HEWITT, L. M., ROWLAND, S. J. Acute toxicity of aromatic and non-aromatic fractions of naphthenic acids extracted from oil sands process-affected water to larval zebrafish. *Chemosphere* 93 (2013) 415-420.

SCHECTER A., MALIK, N., HAFFNER, D., SMITH, S., HARRIS, T. R., PAEPKE, O., BIRNBAUM, L. (2010): Bisphenol A (BPA) in U.S.A. food; *Environ. Sci. Technol.*; 44; p 9425.

SILVA, B. M.; RAVANELI, M. A. C.; PASCHOALATO, C. F. P. R. Toxicidade aguda dos herbicidas diuron e hexazinona à *Danio rerio*. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 20, p.17-28, dez. 2010.

SODRÉ; F; ANTONIO, L. M.; FIGUEIREDO, J. **Sistema limpo em linha para extração em fase sólida de contaminantes emergentes em águas naturais**. *Quim. Nova*, v. 33, n. 1, p. 216–219, 2010.

SONG, M., LIANG, D., LIANG, Y., CHEN, M., WANG, F., WANG, H., JIANG, G. **Assessing developmental toxicity and estrogenic activity of halogenated bisphenol A in zebrafish (*Danio rerio*)**. *Chemosphere* 112 (2014) 275-281.

TAVARES, M. G. O. **Análise físico-química e ecotoxicológica de combustíveis obtidos a partir do craqueamento termo-catalítico de polímeros**. 2008. 81 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Ambientais, Universidade Federal de Goiás, Goiás, 2008.

VANDENBERG, L.V., HAUSER, R., MARCUS, M., OLEA, N., WELSHONS, W.V. (2007) **Human exposure to bisphenol A (BPA)**; *Reprod. Toxicol.*; 24; p 139.

VERLIEFDE, A., CORNELISSEN, E., AMY, G., BRUGGEN, B. V., DIJK, H. (2007) Priority organic micropollutants in water sources in Flanders and Netherlands and assessment of removal possibilities with nanofiltration; *Environ. Pollut.*; 146; p 281.

WANG, J., WANG, X., XIONG, C., LIU, J., HU, B., ZHENG, L. **Chronic bisphenol A exposure alters behaviors of zebrafish (*Danio rerio*)**. *Environmental Pollution* 206 (2015) 275-281.

WILSON, J.D., HOPKINS, W.A., 2013. **Evaluating the effects of anthropogenic stressors on source sink dynamics in pond breeding amphibians**. *Conserv. Biol.* 27,595–604.

WITORSCH, R.J., 2002. **Endocrine disruptors: can biological effects and environmental risks be predicted?** *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 36, 118-130.

ZAGATTO, P. A., BERTOLETTI, E. *Ecotoxicologia Aquática – Princípios e aplicações*. 2ªed. Rima editora. São Carlos-SP. 2008. 486 p.