

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ORLANDO RONALDY DA SILVA SANTOS

**BIOENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS EM ÁGUAS SUPERFICIAIS DA REGIÃO
METROPOLITANA DE MACEIÓ USANDO ZEBRAFISH (*Daniorerio*) COMO
MODELO ANIMAL**

MACEIÓ

2019

ORLANDO RONALDY DA SILVA SANTOS

**BIOENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS EM ÁGUAS SUPERFICIAIS DA REGIÃO
METROPOLITANA DE MACEIÓ USANDO ZEBRAFISH (*Daniorerio*) COMO
MODELO ANIMAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Aline Barros Fidelis de Moura.

Co-orientador: Prof. Dr. José Rui Machado Reys.

MACEIÓ

2019

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária: Taciana Sousa dos Santos – CRB-4 – 2062

- S237b Santos, Orlando Ronaldy da Silva.
Bioensaios ecotoxicológicos em águas superficiais da região metropolitana de Maceió usando zebrafish (*Danio rerio*) como modelo animal / Orlando Ronaldy da Silva Santos. – 2019.
87 f. : il., grafs., tabs. color.
- Orientadora: Maria Aline Barros Fidelis de Moura.
Co-orientador: José Rui Machado Reys.
Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Farmacêuticas. Maceió, 2019.
- Bibliografia: f. 69-75.
Anexos: f. 76-87.
1. Bioensaios. 2. Zebrafish. 3. Água – Análise. 4. Toxidade – Testes. I. Título.
- CDU: 628.113(282)



Ata de Exame de Dissertação

Aos dezessete dias do mês de dezembro de 2019, às quinze horas e trinta minutos, reuniu-se na Sala 204 do PPGCF do ICF/UFAL, a banca examinadora composta pela docente doutora, Maria Aline Barros Fidelis de Moura, e pelos docentes doutores, José Rui Machado Reys, Ticiano Gomes do Nascimento e Valter Alvino da Silva, para o Exame de Defesa da dissertação intitulada: "BIOENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS EM ÁGUAS SUPERFICIAIS DA REGIÃO METROPOLITANA DE MACEIÓ, USANDO ZEBRAFISH (Danio rerio) COMO MODELO ANIMAL", elaborada pelo Mestrando Orlando Ronaldy da Silva Santos, regularmente matriculado no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Nível Mestrado, sob a orientação da Prof. Dra. Maria Aline Barros Fidelis de Moura, que presidiu os trabalhos. Após apresentação por 46 minutos, o mestrando foi arguido pela banca. Em seguida, reunidos em sessão secreta às 16:57 horas, os examinadores consideram a dissertação APROVADA OU () APROVADA COM RESTRIÇÃO, emitindo o seguinte parecer: mediante considerações da banca.

Nada mais havendo a tratar, a sessão foi encerrada às 17:00 horas e eu, Daniel de Brito Ricarte, Secretário do PPGCF, Curso de Mestrado, lavrei a presente ata que segue assinada pela Banca Examinadora e pelo Mestrando.

Maceió, 17 de dezembro de 2019

Presidente (Orientadora): Profª Drª Maria Aline Barros Fidelis de Moura

CPF: _____

Coorientador: Prof. Dr. José Rui Machado Reys

José Rui Machado Reys

CPF: _____

Examinador Interno: Prof. Dr. Ticiano Gomes do Nascimento

Ticiano Gomes do Nascimento

CPF: _____

Examinador Externo: Prof. Dr. Valter Alvino da Silva

Valter Alvino da Silva

CPF: _____

Mestrando: Orlando Ronaldy da Silva Santos

Orlando Ronaldy da Silva Santos

CPF: _____

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos negros, mulheres, gays e indígenas que não se abstiveram de lutar por igualdade de direitos e espaço na sociedade.

À Universidade Federal de Alagoas, por abrir meus olhos para mundo ao meu redor. À CAPES e FAPEAL, pela bolsa pós-graduação que financiou o projeto de pesquisa que resultou nesta dissertação, e ao IMA-AL, pela cooperação científica.

Ao professor Luciano, coordenador do PPGCF, pela presença ativa e paciência.

Com carinho especial, a Lucas, que me apoiou quando passei por problemas psicológicos durante o período do mestrado, e a Painho e Mainha, que cuidaram de mim em casa.

Por fim, aos amigos Adryelle Ribeiro, Edvar Rocetti e Magno Maciel, que participaram das análises externas, e Luan Cândido e Erika Ribeiro, que me acompanharam nas coletas de campo, o meu muito obrigado. Não teria sido possível sem vocês.

"Você está, por acidente ou por destino, vivendo num momento absolutamente crítico na história deste planeta. Qualquer coisa que você esteja interessado em fazer não vai

acontecer se você não puder respirar o ar ou beber água. Não ignore isso."

Carl Sag.

RESUMO

A qualidade da água é uma das maiores preocupações em escala global por ser um parâmetro vital para a manutenção dos ecossistemas e de grande impacto na área da Saúde Coletiva. A avaliação toxicológica da água é importante na determinação da sua qualidade e, neste cenário, os bioensaios são eficientes no estudo dos efeitos de substâncias, sendo o zebrafish um modelo animal de uso crescente neste tipo de ensaio por suas características favoráveis ao manejo laboratorial e alta similaridade com o genoma humano. No contexto anunciado, o estado de Alagoas carece de estudos de avaliação de toxicidade de suas águas e, assim, o presente trabalho tem como objetivo a avaliação toxicológica e da qualidade da água de corpos superficiais locais (Rio Pratagy e Barragem do Catolé) usados como fontes para captação e distribuição de água, através de ensaios físico-químicos, microbiológicos e ensaios de exposição *in vivo* baseados em videomonitoramento comportamental – usando peixes zebrafish adultos –, para identificação, quantificação e avaliação da toxicidade de contaminantes. Os resultados obtidos nas análises de pH, turbidez, cor aparente, salinidade, sólidos dissolvidos, dureza, condutividade, amônia, nitrito, nitrato, metais, cloro residual, sulfato, oxigênio dissolvido, demanda bioquímica de oxigênio, demanda química de oxigênio e coliformes apontaram que as amostras brutas obtidas das duas fontes selecionadas apresentam parâmetros em discordância com a legislação vigente, sendo sua qualidade classificada entre “Ruim” e “Razoável”, através do cálculo do IQA. Nos ensaios de GC-MS/MS para identificação e quantificação de agentes contaminantes químicos não foram detectadas contaminações por pesticidas, no entanto a análise por ICP-MS revelou a presença de metais potencialmente tóxicos nas amostras de água bruta e tratada de ambas as fontes. Os bioensaios com zebrafish revelaram que águas contendo as substâncias identificadas são capazes de provocar alterações neurológicas *in vivo*, afetando diretamente o comportamento dos peixes expostos ($p < 0,05$), o que sinaliza a necessidade da realização de estudos toxicológicos mais aprofundados e periódicos para garantir a segurança da população abastecida e o controle de possíveis danos ambientais.

Palavras-chave: Bioensaio. Poluentes químicos. Análise de água. Zebrafish. Avaliação de toxicidade.

ABSTRACT

Water quality is currently a major concern on a global scale and considered as a vital parameter for the maintenance of ecosystems, in addition to its great impact in terms of Public Health. Toxicological evaluation of water is important in water quality studies. Bioassays are an efficient way of assessing the impact of substances on biological systems and, in this context, zebrafish is a well-established animal model for toxicological assessments. Surface waters of the State of Alagoas lack toxicity evaluation studies. Thus, the present study aims to evaluate the water quality of surface bodies (Pratagy River and Catolé Dam) used as source for catchment, processing and distribution in the Water System of the Alagoas Metropolitan Region, through physical-chemical and microbiological tests for identification and quantification of contaminants, as well as *in vivo* exposure assays for neurotoxicity assessment through a videomonitoring based technique. Analysis of pH, turbidity, apparent color, salinity, dissolved solids, hardness, conductivity, ammonia, nitrite, nitrate, metals, residual chlorine, sulfate, dissolved oxygen, biochemical oxygen demand (BOD), chemical oxygen demand (COD) indicated that the raw water samples obtained from the two selected sources of water demonstrate parameters in disagreement with Brazilian legislation. No traces of pesticides were detected in gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) analysis, however, inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) analysis revealed the presence of potentially toxic metals in both types of water, raw and treated. Our zebrafish bioassays revealed that waters containing the identified substances are capable of inducing neurological alterations *in vivo*, directly affecting the behavior of exposed fish ($p < 0.05$), which indicates the need of conducting periodic toxicological studies to ensure its safety to the population served and the control of possible environmental damage.

Keywords: Bioassay. Chemical pollutants. Water analysis. Zebrafish. Toxicityassessment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Localização geográfica da área em estudo.....	15
Figura 2 – Geomorfologia de Alagoas.....	16
Figura 3 – Disposição dos corpos hídricos na APA do Catolé.....	19
Figura 4 – Área de abrangência da APA Pratagy.....	21
Figura 5 – Representação esquemática do rio Pratagy.....	22
Figura 6 –Mapeamento recente do uso do solo na Bacia do Pratagy.....	23
Figura 7 – Fotografia de peixes da espécie <i>Daniorerio</i> , o zebrafish.....	33
Figura 8 – Fotografia do Kit para coleta e transporte cedido pelo IMA.....	36
Figura 9 – Representação esquemática do designado para o vídeo-monitoramento.....	50
Figura 10 – Definição das zonas de <i>tracking</i> , dos grupos teste e controle e programação de cores e tamanhos para detecção dos animais.....	58
Figura 11 – Representações gráficas da trajetória dos animais durante o período de rastreamento.....	60
Figura 12 – Gráficos de exploração gerados através das médias de ocupação de cada quadrante.....	62

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 – Faixas de IQA por estado e Interpretação referente	28
Quadro 2 –Pesos atribuídos aos parâmetros usados na somatória do IQA	45
Quadro 3 – Pesticidas analisados e seus limites de detecção e quantificação	48
Tabela 1 –Parâmetros adotados na análise por ICP-MS.....	46
Tabela 2 – Resultados das análises físico-químicas referentes ao Catolé.....	52
Tabela 3 – Resultados das análises físico-químicas referentes ao Rio Pratygy.....	53
Tabela 4 – Resultados das análises microbiológicas	54
Tabela 5 – Resultados do cálculo ponderado dos parâmetros de IQA e IQA final ...	55
Tabela 6 – Resultados da quantificação de metais através da técnica de ICP-MS...56	
Tabela 7 – Resultados das análises de pesticidas por GC-MS/MS	57
Tabela 8 – Valores médios obtidos para os parâmetros de motilidade analisados...	60

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

µs/cm–Microsiemens por centímetro

ABNT–Associação Brasileira de Normas Técnicas

ANA – Agência Nacional das Águas

APA– Área de Proteção Ambiental

ATSDR–*Agency for Toxic Substances and Disease Registry*

CASAL –Companhia de Saneamento de Alagoas

CEUA– Comitê de Ética no uso de animais

CNRH – Conselho Nacional de Recursos Hídricos

CONAMA – Conselho Nacional de Meio Ambiente

DBO– Demanda Bioquímica de Oxigênio

DQB– Demanda Química de Oxigênio

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

FUNASA–Fundação Nacional de Saúde

ICP-MS–Espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente

IMA/AL– Instituto do Meio Ambiente de Alagoas

IQA– Índice de Qualidade da Água

IQA – Índice de Qualidade das Águas

L.D.– Limite de detecção

MS – Ministério da Saúde

NMP–Número Mais Provável

OD – Oxigênio Dissolvido

OECD–*Organisation for Economic Co-operation and Development*

pH– Potencial de Hidrogênio

RNQA – Rede Nacional de Monitoramento de Qualidade da Água

SDT– Sólidos Dissolvidos Totais

SEMARH–Secretaria do Estado do Meio Ambiente e Recursos Hídricos de Alagoas

SEPLANDE – Secretaria de Estado do Planejamento e do Desenvolvimento Econômico de Alagoas

SNIRH – Sistema Nacional de Informações sobre Recursos Hídricos

UT– Unidades de turbidez

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo Geral	14
2.2 Objetivos Específicos.....	14
3 REVISÃO DA LITERATURA	15
3.1. Caracterização da área em estudo	15
3.1.1 APA do Catolé e Fernão Velho	17
3.1.2 APA Pratagy.....	20
3.2 Qualidade da água	23
3.2.1 Parâmetros e padrões físico-químicos	23
3.2.2 Padrões microbiológicos	26
3.2.3 Regulamentação legal e Índice de Qualidade da água - IQA.....	28
3.3 Avaliação toxicológica da água	30
4 METODOLOGIA	35
4.1 Coleta	35
4.2. Análise Físico-química preliminar.....	37
4.2.1 Condutividade elétrica, salinidade, pH, OD e temperatura.....	37

	12
4.2.2 Turbidez	38
4.2.3 Sólidos Dissolvidos Totais (SDT)	38
4.2.4 Cor aparente	38
4.2.5 Dureza total.....	39
4.2.6 Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO).....	39
4.2.7 Demanda Química de Oxigênio (DQO)	40
4.2.8 Amônia, Nitrato e Nitrito	40
4.2.9 Ferro Total	41
4.2.10 Cloreto	42
4.2.11 Sulfato.....	42
4.3 Análise microbiológica.....	42
4.4 Determinação do Índice de Qualidade da Água - IQA	44
4.5 Identificação e quantificação de micropoluentes tóxicos.....	45
4.5.1 Íons inorgânicos e Metais	45
4.5.2 Pesticidas.....	46
4.6 Bioensaios com zebrafish para avaliação de toxicidade <i>in vivo</i>	48
4.7 Tratamento estatístico.....	51
5 RESULTADOS	52
5.1 Análise Físico-química preliminar	52
5.1.1 Barragem do Catolé.....	52
5.1.2 Rio Pratagy	53
5.2 Análise microbiológica	54
5.3 Índice de Qualidade da Água	55
5.4 Identificação e quantificação de contaminantes tóxicos.....	55
5.4.1 Metais	55
5.4.1 Pesticidas.....	57
5.5 Bioensaios com zebrafish	58
6 DISCUSSÃO.....	63
7 CONCLUSÕES.....	68
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
9. ANEXOS	76

1. INTRODUÇÃO

Frente ao crescimento da população global, das mudanças climáticas e das atividades antrópicas, ou seja, aquelas decorrentes de ações humanas, o controle da qualidade da água e a sua disponibilidade são dois dos principais desafios enfrentados na atualidade, em escala global e local, principalmente tendo-se em vista o objetivo de alcançar desenvolvimento humano aliado com a preservação do meio ambiente (KERSKI, 2014). A água é o principal recurso natural e dele depende a manutenção da vida na Terra (UNESCO, 2016).

Dada a crescente produção de poluentes, principalmente em países em desenvolvimento, como é o caso do Brasil, os corpos de água superficiais, como rios e lagos, vêm sofrendo contaminações que impactam diretamente na sua qualidade e segurança de uso. Estas águas superficiais mostram-se vulneráveis à contaminação por estarem mais expostas, se comparadas com águas subterrâneas, e pela tendência natural dos aglomerados humanos concentrarem-se nas suas proximidades, sendo a água um recurso precioso para o desenvolvimento das cidades e essencial para a manutenção dos ecossistemas(PARRIS, 2011).

Na região metropolitana de Maceió, diversas fontes de água doce são exploradas para dar suporte ao comércio, indústria, agricultura, pecuária e ao abastecimento domiciliar (ELIS; BARROSO; KIANG, 2004). Entre os corpos de água doce superficiais, destacam-se a Bacia do Pratagy, a partir de onde é feito o abastecimento dos bairros situados na parte baixa da capital, e o Sistema Catolé, que abastece a maior porção de bairros da parte alta da cidade.

A bacia citada é composta principalmente pelo Rio Pratagy e seus efluentes, enquanto que o sistema Catoléé baseado basicamente na água contida na chamada Barragem do Catolé e no riacho de mesmo nome. Apesar de ambos os corpos de água situarem-se em Áreas de Proteção Ambiental - APA permanentes, o que se verifica na realidade local é uma grande pressão urbana contra a APA Catolé, por sua proximidade com os bairros Santos Dummont e Fernão Velho, e desmatamento

da mata ciliar para atividades agrícolas e agropecuárias no curso do Rio Pratygy (CASAL, 2015).

Diversas espécies químicas provenientes das atividades humanas são prejudiciais para o ecossistema e para a saúde da população, podendo causar intoxicações agudas ou crônicas, a depender das características químicas dessas substâncias, das suas concentrações no meio, do tempo em que os organismos vivos estão expostos e da biologia destes organismos (PERRON et al., 2010); sendo assim, a avaliação constante da qualidade dos recursos naturais disponíveis, seja por parte de órgãos reguladores ou em estudos independentes, torna-se algo imprescindível.

Dentre as contaminações aquáticas de ordem química em geral, os agentes tóxicos de detecção mais comum são metais, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, produtos agroquímicos e farmacêuticos; advindos principalmente de efluentes industriais e domésticos, da queima de combustíveis fósseis, da agricultura e do lixo urbano (BOXALL et al., 2012; PARRIS, 2011).

Dentre os variados modelos animais disponíveis para avaliação de toxicidade de substâncias, os peixes da espécie *Daniorerio* (conhecidos como zebrafish) têm tido destaque crescente devido às suas características biológicas favoráveis ao uso laboratorial, como desenvolvimento rápido e tecidos transparentes, além do baixo custo de manutenção (SIPES; PADILLA; KNUDSEN, 2011).

Desta forma, análises de amostras de água de corpos superficiais possibilitam a identificação de possíveis agentes que podem prejudicar a biodiversidade local, ao passo que estudos toxicológicos das fontes de água que abastecem as cidades são de relevância vital para garantir a manutenção do seu uso por parte da população, com a garantia de que esta não irá causar danos à saúde dos seus usuários, além de embasar a adoção de medidas corretivas e estimular reforço nos esforços adotados pelos órgãos competentes para proteção destes corpos d'água e de seus territórios circundantes.

Neste contexto, até o presente momento, nenhum registro foi identificado na literatura especializada de estudo científico voltado para a avaliação toxicológica dos

efeitos *in vivo* de contaminantes presentes nas águas superficiais do estado de Alagoas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a qualidade e a segurança das águas de corpos superficiais na região metropolitana de Maceió, através de bioensaios usando o modelo animal zebrafish.

2.2 Objetivos Específicos

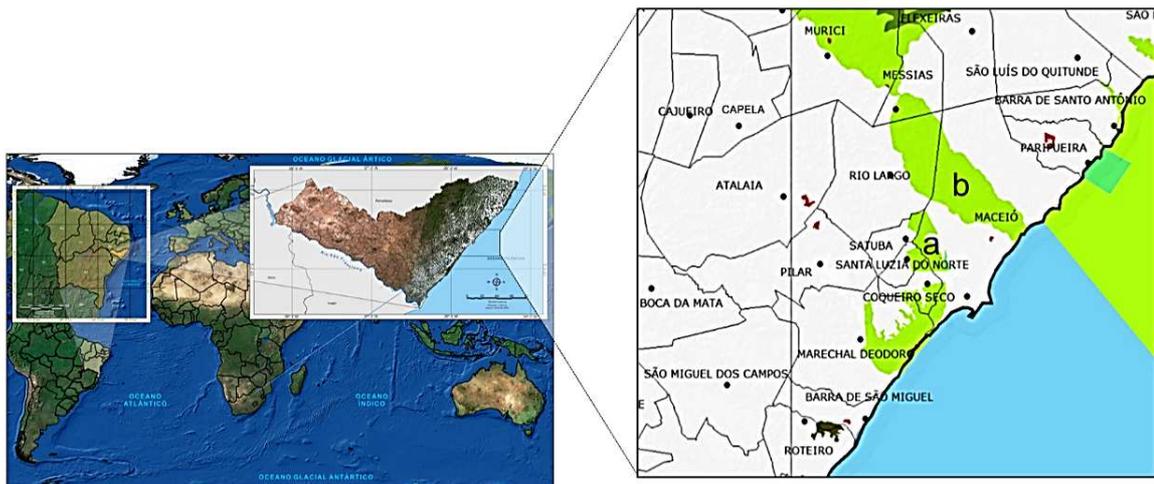
- Analisar os aspectos físico-químicos e microbiológicos da água;
- Calcular o Índice de Qualidade de Água (IQA) das fontes selecionadas;
- Analisar a presença de pesticidas e metais pesados nas amostras e quantificá-los;
- Avaliar *in vivo* a toxicidade potencial das amostras, em termos comportamentais, utilizando bioensaios com zebrafish.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Caracterização da área em estudo

O Rio Pratagy e a Barragem do catolé são corpos água doce superficiais que se localizam em APAs situadas na Região Metropolitana de Maceió, estado de Alagoas, Região Nordeste do Brasil; compreendendo, mais especificamente, territórios dos municípios de Maceió, Messias e Rio Largo (Figura 1).

Figura 1–Localização geográfica da área em estudo. a) APA Catolé e Fernão Velho e b) APA Pratagy.



Fonte: Adaptado de SEPLANDE, 2014.

A morfologia do terreno onde se localizam os corpos d'água de interesse é basicamente dividida em duas unidades (Figura 2a): os tabuleiros costeiros, que podem alcançar de 20 a 30 metros de altitude, e a planície litorânea, onde ficam os bairros da chamada “parte baixa” da capital alagoana(ELIS; BARROSO; KIANG, 2004).

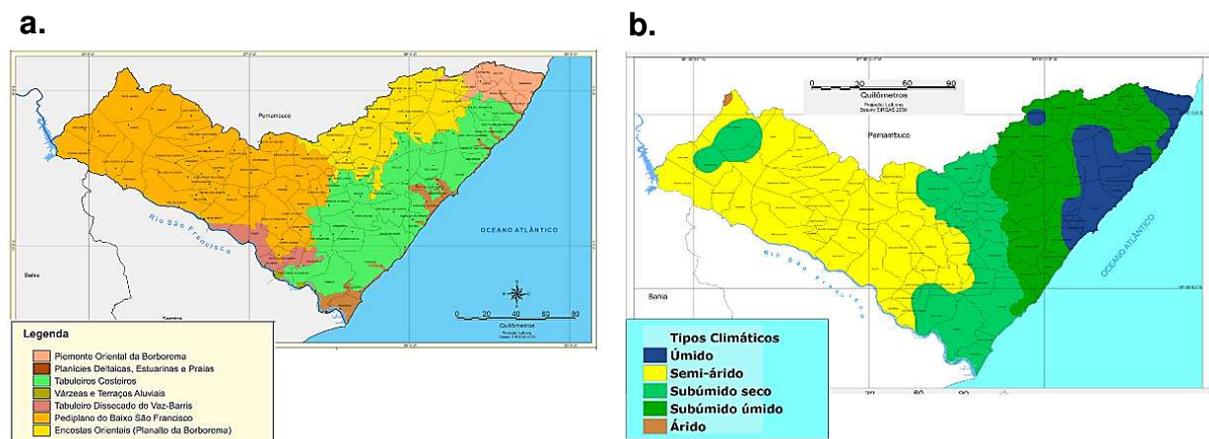
A Barragem do catolé situa-se na região composta por tabuleiros e atende aos bairros da mesma área, enquanto que o Rio Pratagy atravessa as duas unidades geomorfológicas, desaguando nas proximidades do Bairro de Riacho Doce, em Maceió. Através do sistema de captação, tratamento e distribuição da CASAL, as águas deste rio, juntamente com as captadas de poços profundos, abastecem a parte litorânea da capital, além dos bairros Jacintinho e Feitosa.

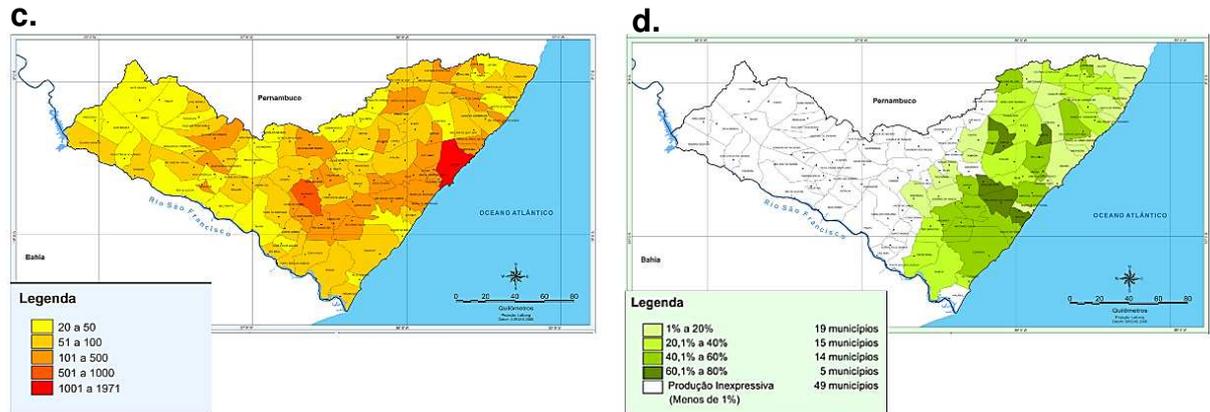
O clima do local, que interfere diretamente na reserva hídrica e vazão dos corpos d'água em estudo, é do tipo Tropical e seu subtipo varia entre úmido e subúmido úmido(Figura 2b), tendo como estação chuvosa o período de maio a julho. A região apresenta baixa amplitude térmica, com altas temperaturas ao longo de todo o ano(SANTOS et al., 2000).

Quanto aos aspectos sociais e econômicos relacionados com a área em estudo, observa-se que os municípios componentes da região metropolitana apresentam a maior densidade demográfica do estado(Figura 2c). Embora o município de Maceió, onde está localizada a maior parte dos territórios das APAs em estudo, exiba uma taxa de coleta de lixo de que varia entre 95% e 100%, os municípios de Messias e Rio Largo possuem deficiência no que diz respeito à coleta domiciliar (SEPLANDE, 2014).

Para os mananciais da região, um fator de risco importante a ser considerado é o cultivo extensivo da cana-de-açúcar, especialmente no entorno da APA Pratagy. Em Messias, onde nasce o Rio Pratagy, 60% a 80% do território municipal é ocupado por lavouras de cana, como pode ser visto na figura 2d.

Figura 2 –a. Geomorfologia de Alagoas; b. Tipos Climáticos; c. Densidade demográfica (2014); d. % de área ocupada por cana-de-açúcar (2013).





Fonte: Adaptado de ANDRADE, 2009.

3.1.1. APA do Catolé e Fernão Velho

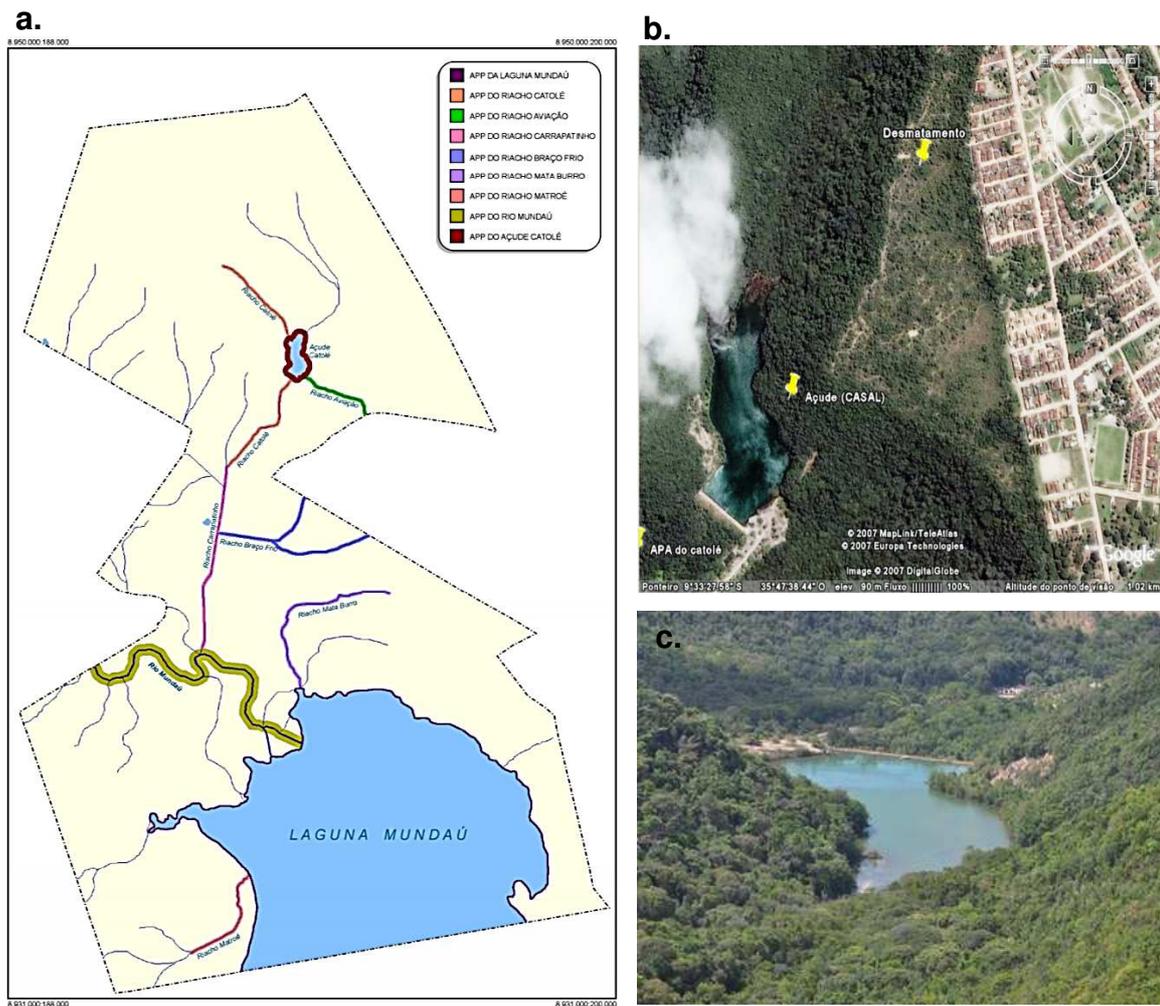
Segundo o Instituto do Meio Ambiente de Alagoas – IMA/AL(2015), a APA do Catolé e Fernão Velho(Figura 3a), onde localiza-se a barragem do Catolé(Figura 3c), foi criada com o objetivo de preservar a área e controlar a ocupação deste território, tendo em vista a proximidade dos bairros circunvizinhos (Figura 3b). Trata-se de uma área de conservação Estadual de uso sustentável, com área total de 3.817 hectares (38,17 km²), distribuídos entre os municípios de Satuba, Santa Luzia do Norte, Coqueiro Seco e Maceió (SEPLANDE, 2014).

O principal rio a atravessar a unidade é o Mundaú, mas verificam-se outros cursos d'água com grande importância hídrica, como o rio Satuba, além de diversos riachos, como o Carrapatinho e o Matroê. Ainda de acordo com o IMA/AL (2015), a APA guarda um importante remanescente de Mata Atlântica, que circunda o manancial Catolé-Cardoso, responsável pelo abastecimento de 20% da capital. Os ecossistemas presentes nesta reserva variam de floresta ombrófila ao mangue(SEPLANDE, 2014).

Segundo o ato de criação da APA Catolé e Fernão Velho, a delimitação da área (Figura 3a) é dada da seguinte maneira:

O Ponto 0 será o Monumento Rodoviário, situado no centro do canteiro do cruzamento BR 316 e BR 104. Segue em direção Nordeste, pelo eixo da BR 104, até o entroncamento com a Rodovia de acesso à Usina Utinga Leão, Ponto 1, no Tabuleiro do Pinto, que dá acesso à Usina Central Utinga Leão. Seguindo pelo eixo desta Rodovia na direção Oeste, até o cruzamento com a estrada vicinal. Ponto 1, que dá acesso à Fazenda Pinto, a propriedade do Sr. Gregory Smith, tangenciando a extremidade Leste do Campo de Pouso da MANAL (Manutenção Alagoana de Aeronáutica) na direção Sul, até encontrar o Ponto 3, localizado no encontro dessa estrada com a Linha de Transmissão (Subestação Tabuleiro do Martins, no Clima Bom). Segue acompanhando a Linha de Transmissão acima mencionada, na direção Sudeste, até encontrar o Ponto 4, no cruzamento dessa Linha de Transmissão com a Linha Divisória dos Municípios de Maceió e Satuba, seguindo por esta em direção Sudoeste, até encontrar o Ponto 5, situado no encontro da Linha Divisória dos Municípios de Maceió e Satuba, nas margens do Rio Satuba. Daí segue em direção Sudeste, pela Linha Divisória dos Municípios de Maceió e Santa Luzia do Norte, contígua ao Rio Satuba, até o Ponto 6, localizado no encontro da Linha Divisória dos Municípios de Maceió e Satuba, com a rede de alta tensão próxima à Indústria Profertil, até o Ponto 7, localizado no encontro desta rede de alta tensão, com a estrada de acesso à Santa Luzia do Norte, daí seguindo na direção Sudeste, em linha reta, até encontrar o Ponto 8, localizado no encontro da estrada Santa Luzia do Norte/Coqueiro Seco com a Linha Divisória desses dois Municípios; daí seguindo em direção Leste, em linha reta, pela Lagoa Mundaú, até encontrar o Ponto 9, identificado pelo Reservatório da CASAL R8, localizado no bairro da Chã de Bebedouro, em frente ao Centro Comunitário Élia Porto Lages. Deste ponto, segue em linha reta na direção Noroeste, pelo eixo da Estrada de Santa Amélia, até o Ponto 10, localizado no trevo de acesso à Fernão Velho e Tabuleiro do Martins, na altura do conjunto Residencial Colina dos Eucaliptos, seguindo para a direita, na direção Nordeste, até o Ponto 11 localizado no cruzamento da estrada de acesso à Fernão Velho com a Linha de Transmissão (Subestação do Pinheiro e Subestação de Rio Largo). Daí, seguindo a Linha de Transmissão, na direção Noroeste, até o Ponto 12, localizado no cruzamento desta Linha de Transmissão com a Rodovia BR 316, na Ladeira do Catolé e, finalmente, seguindo o eixo desta Rodovia, na direção Nordeste, até encontrar o Ponto 13/Ponto 0 no Monumento Rodoviário, situado no centro do canteiro do cruzamento BR 316 e BR 104. (ALAGOAS, 1992, p. 1-2)

Figura 3– a. Disposição dos corpos hídricos dentro da APA Catolé e Fernão Velho; **b.** Foto de satélite mostrando a proximidade com os bairros vizinhos e áreas de desmatamento dentro da APA; **c.** Foto aérea da Barragem do Catolé.



Fonte: Adaptado de ANDRADE; OLIVEIRA; SANTOS, 2009 (a); BATINGA et al, 2010 (b) e VERDE, 2010 (c).

Apesar das ações promovidas pelos órgãos de proteção ao Meio Ambiente e da presença do Batalhão de Polícia Ambiental no local, a degradação por ação antrópica na APA Catolé e Fernão Velho encontra-se em níveis alarmantes. Diversos problemas ambientais – já documentados na literatura ou veiculados na mídia

através de notícias – põem em risco os recursos naturais da região. São exemplos de impactos negativos observados na área: flagrantes de desmatamento, queimadas e ocupação irregular do terreno (BATINGA et al, 2010; VERDE, 2010). Diversas notícias são disponibilizadas no endereço eletrônico do Instituto do meio Ambiente de Alagoas sobre tais ações prejudiciais observadas na APA em questão.

Quanto ao desenvolvimento urbano nos entornos da APA e seus consequentes problemas socioambientais, o que se verifica na localidade não é apenas a pressão da população local sobre a área, mas também a própria máquina de administração pública, que deveria zelar pela proteção do ecossistema. Como exemplo, Verde (2010) cita o desmatamento da mata, autorizado pela Prefeitura de Maceió, para passagem de tubulações referentes ao sistema de drenagem do Bairro Santos Dumont. O correspondente a uma área de 1 km de comprimento por 30 metros de largura de mata nativa desta APA foi derrubada durante a realização da obra supracitada.

Ainda, de acordo com notícias veiculadas pela prefeitura de Maceió (MACEIO.AL.GOV.BR, 2017), verifica-se a existência de uma usina de produção de asfalto dentro da APA Catolé e Fernão Velho, a qual é responsável pela produção do asfalto usado na pavimentação e reparos de vias da capital alagoana. As misturas asfálticas em geral incluem em sua composição química substâncias conhecidas como tóxicas, como benzenos, naftalenos, e metais pesados como níquel (CÁRDENAS; FONSECA, 2009). Os efluentes da produção de asfalto podem contaminar o solo e chegar aos corpos d'água da região através das chuvas, como já foi sinalizado por Batinga et al (2010), durante um levantamento dos riscos ambientais presentes nesta área de conservação; além de que os vapores produzidos pelo aquecimento das misturas asfálticas podem espalhar hidrocarbonetos tóxicos por grandes distâncias, através do ar e do vento.

3.1.2 APA Pratagy

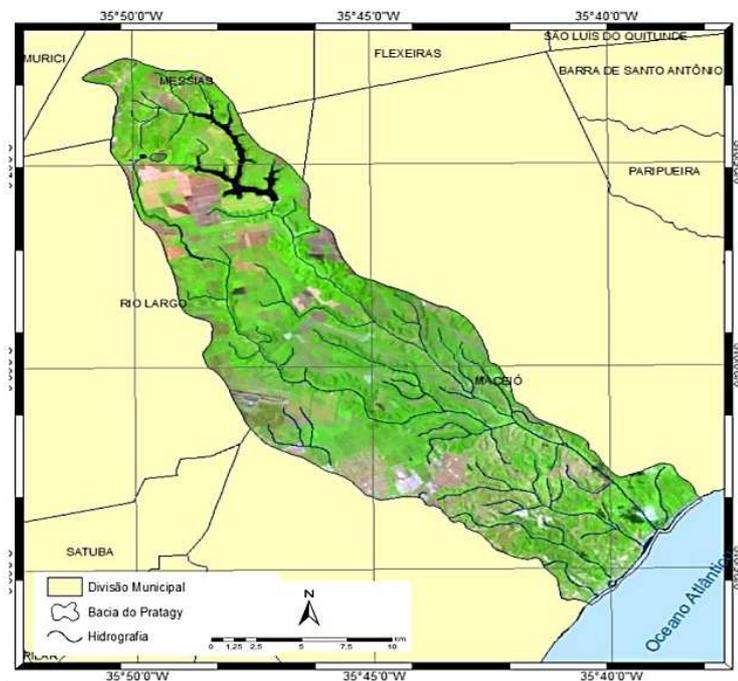
Com objetivos semelhantes ao da APA Catolé e Fernão Velho, mas com foco especial na proteção dos recursos hídricos, a Área de Proteção Ambiental Permanente do Pratagy (APA Pratagy, figura 4) foi criada em 1998 e tem uma área

de 13369,5 hectares, com terras situadas entre os municípios de Messias, Rio Largo e Maceió (IMA-AL, 2015); abrangendo toda a Bacia Hidrográfica do Pratagy (Figura 5a)– considerada como o maior manancial de abastecimento da capital do estado de Alagoas, com área de drenagem de 194,5 km² (SEMARH, 2019).

A delimitação oficial da área de conservação foi instituída pelo decreto 37.589/98, como determinado no seu artigo 2º:

Para os fins previstos neste Decreto, será considerado como APA DO PRATAGY, toda a extensão da Bacia Hidrográfica do Rio Pratagy, uma área aproximada de 13.369,50 ha, delimitada pelo seu divisor de águas cuja delimitação realizada em 1993 através do Diagnóstico Físico Conservacionista da Bacia Hidrográfica do Rio Pratagy, publicado pelo Instituto do Meio Ambiente do Estado de Alagoas, através do Projeto IMA/GTZ, além de uma faixa de restrição de uso e ocupação no entorno do divisor de águas com largura de 1.000m. (ALAGOAS, 1998, p. 1)

Figura 4 – Área de abrangência da APA Pratagy/Bacia hidrográfica do Pratagy.

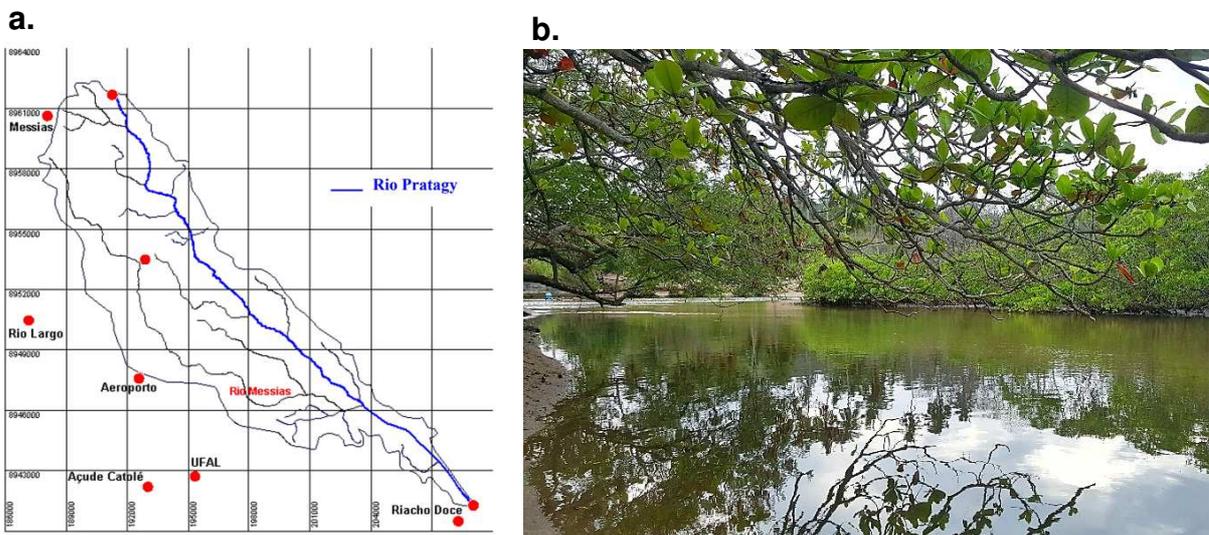


Fonte: Adaptado de TAVARES; NETO, 2018.

A vegetação remanescente predominante na APA Pratagy é a de floresta ombrófila, típica de regiões de Mata Atlântica, e encontra-se preservada principalmente nas áreas de encostas (KAWAKUBO et al, 2005). O nome da

unidade conservação é uma referência ao seu principal rio, o Pratagy (Figuras 5b e 5c). Este rio possui nascente na zona rural do município de Messias e foz no bairro de Riacho Doce, em Maceió, percorrendo a distância aproximada de 32 km. Seu principal afluente é o rio Messias, mais conhecido localmente pelo nome de Rio do Meio (IMA, 2015).

Figura 5 – a. Representação esquemática do curso do rio Pratagy; b. Fotografia de trecho do Rio Pratagy, capturada durante as coletas *in situ*.



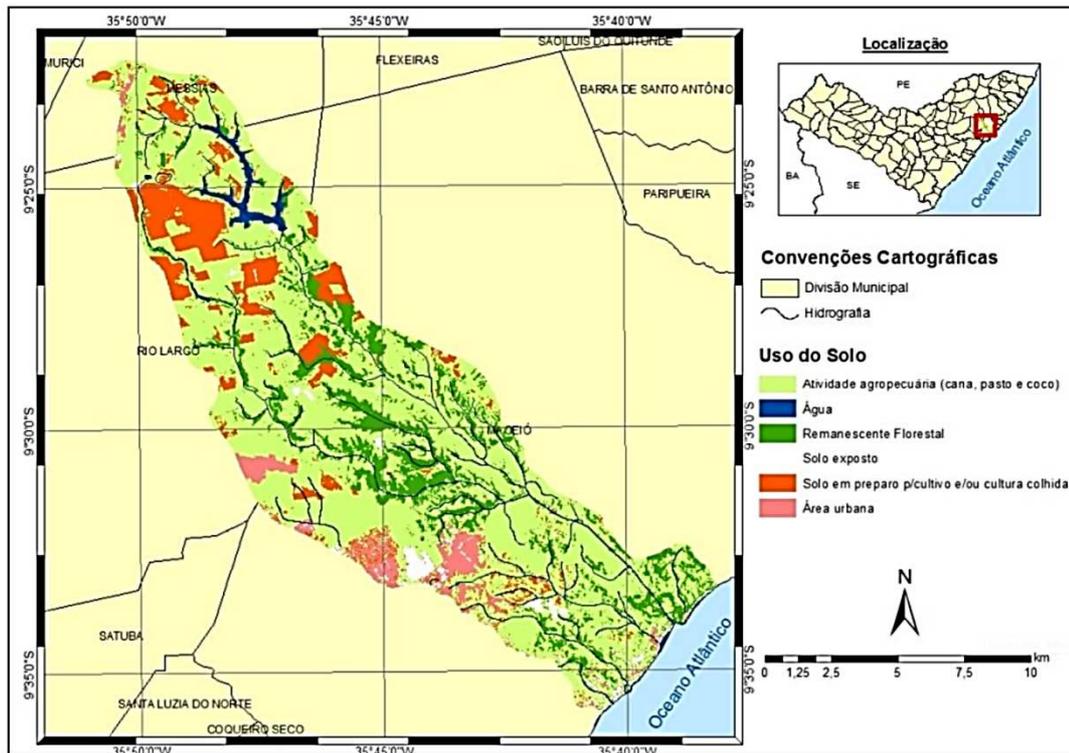
Fonte: SILVA et al, 2005 (a); o autor (b).

Dada a criação relativamente recente da unidade de conservação, a presença de várias propriedades particulares no local e as poucas ações visando a sua preservação no período anterior a sua formalização, a área que compreende a APA Pratagy apresenta-se em um estágio de deterioração muito avançado. Conforme pode ser visto na figura 5, apenas 16,5% da área da Bacia do Pratagy apresenta cobertura por mata remanescente original. Dentre as ações antrópicas prejudiciais, o principal problema verificado na área é a grande extensão de terras sendo utilizada para atividades agropecuárias, em especial para o cultivo da cana (KAWAKUBO et al, 2005).

A ocupação urbana acontece predominantemente na região do Bairro do Benedito Bentes, na Capital. Sendo reconhecida como área de renda mais baixa, por problemas sanitários e crescimento desordenado, a região nas proximidades do

bairro do Benedito Bentes – onde fica localizada a estação Pratagy de tratamento de água da CASAL – sofre, também, pelo lançamento irregular de esgoto e problemas na coleta de lixo, além do desmatamento irregular para a comercialização de lenha.

Figura 6 –Mapeamento recente do uso do solo na Bacia do Pratagy, demonstrando a extensão de ações antrópicas na área.



Fonte: KAWAKUBO et al, 2005.

3.2. Qualidade da água

3.2.1 Parâmetros e padrões físico-químicos

Um estudo sobre qualidade da água depende de qual é a finalidade de uso deste recurso e baseia-se na avaliação de característica químicas, físicas e biológicas de amostras, diante de padrões previamente definidos, e varia de acordo com a localidade onde o estudo é conduzido – especialmente no que diz respeito à legislação local e disponibilidade de recursos destinados para esta finalidade

(KERSKI, 2017). Quando o objetivo é a análise de água potável, esses estudos têm grande relevância no desenvolvimento de políticas públicas e grande impacto em termos de saúde coletiva.

As análises físico-químicas preliminares aos bioensaios fornecem informações importantes sobre as características das amostras que serão testadas, como quais classes de substâncias estão presentes nas amostras, quais parâmetros encontram-se fora dos padrões desejáveis e a extensão desses desvios. Tais informações são vantajosas no delineamento dos ensaios de toxicidade posteriores, pois permite a seleção do modelo animal, o seu estágio de desenvolvimento e os tipos de testes mais adequados para avaliar os efeitos tóxicos que podem ser causados pelas substâncias detectadas. Além da influência sobre o *design* dos bioensaios, os resultados de análises físico-químicas e microbiológicas auxiliam na interpretação dos resultados obtidos após a etapa de exposição *in vivo*, pois é possível associar determinado efeito observado nos bioensaios com os efeitos tóxicos teóricos esperados, previamente descritos na literatura, decorrentes de exposição aos contaminantes presentes nas amostras (NEALE et al, 2017).

Quanto aos parâmetros físicos e químicos considerados na análise da qualidade amostras de água, os fatores básicos analisados são cor, temperatura, sólidos dissolvidos, condutividade, dureza, pH, turbidez, salinidade, oxigênio dissolvido, demanda bioquímica de oxigênio, demanda química de oxigênio, compostos nitrogenados, sulfatos, ferro e cloro (ANA, 2018). Além destes, pode-se incluir a quantificação e detecção de outras classes de substâncias determinadas em função da realidade socioambiental do local em estudo ou por suspeitas de contaminação por fontes específicas.

Como um dos mais simples parâmetros avaliados, a temperatura exerce influência direta sobre a dissolução de substâncias na água e influencia o ciclo de vida natural das espécies que nela habitam, especialmente no tocante à reprodução de peixes. Embora a água na sua forma mais pura se apresente de forma incolor, a cor da água proveniente do meio ambiente é um reflexo da variedade e concentrações das substâncias nela dissolvidas. Matéria orgânica dissolvida pode impactar no escurecimento da água, enquanto compostos ferrosos podem acarretar no seu amarelamento, por exemplo. O Ministério da Saúde estabelece o valor

máximo permitido para cor aparente como sendo de 15 uH (ANA, 2018; CETESB, 2014; FUNASA, 2013).

Os sólidos dissolvidos totais (SDT) presentes na água incluem todas as substâncias que eventualmente passam a fazer parte da sua composição, especialmente pelo processo de lixiviação – dissolução e incorporação dos constituintes do solo. No Brasil, a quantidade de até 100 mg/L de SDT é permitida para águas classificadas como potáveis. As substâncias dissolvidas na água impactam na sua condutividade, dureza e turbidez. Os íons presentes na água determinam a sua capacidade de conduzir corrente elétrica e, desta forma, a condutividade é um bom parâmetro para avaliação da mineralização da água. Íons alcalino-terrosos, como cálcio e manganês, e cátions, como ferro e zinco, são responsáveis pela dureza da água, que é expressa na forma da quantidade equivalente de CaCO_3 e cujo valor máximo permitido em águas potáveis é de até 500 mg/L; enquanto que a turbidez reflete a quantidade de sólidos presente na água. A turbidez impacta na transparência e no valor estético da água, sendo este um parâmetro especialmente importante na etapa de floculação, durante o tratamento da água. O valor de até 5,0 Unidades de Turbidez (UT) é aceito para portabilidade (CETESB, 2011; FUNASA, 2013).

Além de ser um fator ligado diretamente com as funções fisiológicas ótimas dos organismos aquáticos, o pH é extremamente importante nos processos de tratamento pois dele dependem as etapas de floculação e coagulação, refletindo, ainda, no processo de redução da carga microbiana da água. Um valor de pH situado entre 6,0 e 9,5 é o recomendado pelo Ministério da Saúde para água potável. Em laboratório, o PH pode ser determinado por métodos colorimétricos ou, com maior precisão, por potenciometria (ANA, 2018; FUNASA, 2013).

O oxigênio de dissolvido na água é essencial para a manutenção das funções fisiológicas dos seres vivos que nela habitam. A quantidade de O_2 dissolvido pode aumentar em função da fotossíntese de plantas aquáticas, ou reduzir, nos casos de eutrofização e aumento de temperatura. O consumo do oxigênio disponível na água para que haja a oxidação da matéria orgânica dissolvida nela é avaliado pelos ensaios de Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) e a Demanda Química de Oxigênio (DQO), que refletem, respectivamente, a oxidação bioquímica natural –

realizada por seres vivos, como bactérias –, e a oxidação química desses compostos orgânicos – como a promovida por ácidos, por exemplo (ANA, 2018; CETESB, 2011; FUNASA, 2013).

Alguns nutrientes dissolvidos também são importantes indicadores da qualidade da água. Esses nutrientes, como fósforo e nitrogênio, podem ser carregados para água por processos lixiviadores ou pela contaminação por esgoto doméstico/efluentes industriais, que costumam apresentar grandes concentrações desses compostos, e por fertilizantes agrícolas (FUNASA, 2013).

Como último parâmetro, a quantificação de cloro é feita devido ao seu uso na desinfecção da água nos sistemas de tratamento tradicionais, através da aplicação de produtos químicos como hipoclorito de cálcio, hipoclorito de sódio e cloro gasoso. Os cloretos presentes na água podem conferir sabor desagradável e, quando ingeridos, causar um efeito laxativo. Como os sistemas de tratamento convencionais não removem cloretos, então é necessária a realização de processos de deionização ou evaporação quando se deseja reduzir ou eliminar a sua presença. A análise do cloro residual livre, que pode ser feita por colorimetria ou métodos titulométricos, é essencial na avaliação do processo de tratamento e da quantidade de produtos químicos que estão sendo usadas; dessa forma, o Ministério da Saúde recomenda que a sua concentração esteja entre 0,2 mg/L e 2,0 mg/L em todas as etapas do processo de tratamento, até a sua chegada ao consumidor final (ANA, 2018; CETESB, 2014; FUNASA, 2013).

3.2.2 Padrões microbiológicos

A água pode passar a ser veículo de transmissão de doenças quando contaminada por microrganismos patogênicos, como é o caso, por exemplo, das bactérias *Yersinia enterocolitica* e *Salmonella sp.* – causadoras de gastroenterites e da febre tifoide. Desta forma, a análise microbiológica da água é necessária para avaliação de sua qualidade e segurança de uso (FUNASA, 2013). Em monitoramentos de rotina são realizadas quantificações de microrganismos indicadores de contaminação fecal, pois estes indicam o risco de presença de

microrganismos enteropatogênicos nas amostras. Além da exigência legal da realização de análises microbiológicas de rotina, análises microbiológicas são executadas especialmente em casos de surto de doenças potencialmente veiculadas pelo contato com água e em estudos de vigilância epidemiológica (CETESB, 2011).

A água potável deve, necessariamente, não conter microrganismos patogênicos. Os indicadores de contaminação fecal de água mais comumente avaliados são os coliformes, tendo a bactéria *Escherichia coli* como a representante mais conhecida deste grupo de microrganismos. De acordo com a Fundação Nacional de Saúde (2013), os coliformes são bacilos gram-negativos, em forma de bastonetes, aeróbios ou anaeróbios facultativos, que fermentam a lactose a 35-37°C e produzem ácido, gás e aldeído, além de serem oxidase-negativos e não formarem esporos. A quantificação de coliformes na água pode ser feita na totalidade desta classe, incluindo espécies dos gêneros *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella* e *Enterobacter*; apenas da fração de microrganismos termotolerantes, que são exclusivamente de origem fecal; ou ainda fazendo unicamente a contagem de *E. coli*, que é considerada uma bactéria de ótima especificidade como indicadora de contaminação fecal.

Coliformes têm uma vida útil na água mais longa que a de outros microrganismos patogênicos intestinais por serem menos exigentes do ponto de vista nutricional e sua identificação e quantificação é relativamente prática e econômica. Existem diversas técnicas padronizadas para tal finalidade; as que são adotadas pelos órgãos de controle brasileiros, como a ANVISA, são baseadas no manual *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* da *American Public Health Association (APHA)* e publicações da *American Water Works Association (AWWA)* e *Water Environment Federation*; sendo a determinação da quantidade de microrganismos feita normalmente na forma de Número Mais Provável – NMP (FUNASA, 2013).

Além de contaminação fecal, análises microbiológicas de água são usadas na avaliação da eficácia de processos de tratamento – que normalmente visam a redução da carga microbiana da água – e na avaliação da disponibilidade de

nutrientes essenciais ao crescimento bacteriano, especialmente pela contagem de bactérias heterotróficas aeróbicas (CETESB, 2011).

3.2.3 Regulamentação legal e Índice de Qualidade da água - IQA

No Brasil, o órgão responsável pela regulação, monitoramento e planejamento do uso dos recursos hídricos é a Agência Nacional das Águas (ANA), sendo criada com a incumbência de fazer cumprir os objetivos e diretrizes da chamada “Lei das Águas do Brasil”, a lei nº 9.433 de 1997 (ANA, 2018).

Esta agência gere a Rede Nacional de Monitoramento de Qualidade da Água (RNQA), na qual os estados que realizam o monitoramento da qualidade das suas águas compartilham os dados obtidos através do Sistema Nacional de Informações sobre Recursos Hídricos. Dentre os diversos indicadores adotados pela ANA para avaliação da qualidade das águas, o Índice de Qualidade das Águas (IQA) é considerado o principal; sendo este calculado a partir de diversos parâmetros físico-químicos e microbiológicos observados nas amostras de água analisadas (ANA, 2018; CETESB, 2014).

A determinação do IQA depende da avaliação de nove parâmetros: oxigênio dissolvido, coliformes fecais, pH, demanda bioquímica de oxigênio, temperatura, nitrogênio total, fósforo total, turbidez e sólidos dissolvidos totais. O método de cálculo encontra-se detalhado na metodologia e a interpretação dos resultados obtidos pode ser feita segundo o quadro abaixo (Quadro 1), disponível no endereço eletrônico da ANA.

Quadro 1 – Faixas de IQA por estado e Interpretação referente.

Faixas de IQA utilizadas nos estados:		Avaliação da qualidade da água
AL, MG, MT, PR, RJ, RN, RS	BA, CE, ES, GO, MS, PB, PE, SP	
91-100	80-100	Ótima
71-90	52-79	Boa
51-70	37-51	Razoável

26-50	20-36	Ruim
0-25	0-19	Péssima

Fonte: ANA, 2018.

Resumidamente, a relevância dos parâmetros envolvidos no IQA, de acordo com a CETESBE (2014), dá-se pelo fato de que o oxigênio dissolvido é essencial para manutenção dos organismos que vivem na água e pode indicar indiretamente eutrofização; os coliformes fecais indicam contaminação de origem fecal e presença de microrganismos com potencial para transmissão de doenças; o pH influencia indiretamente a solubilidade de nutrientes no meio aquático e, diretamente, a fisiologia dos organismos; a demanda bioquímica de oxigênio indica a quantidade de oxigênio necessária para que bactérias oxidem a matéria orgânica dissolvida na água; a temperatura possui grande influência sobre os demais parâmetros físicos da água, como a viscosidade, e também sobre a reprodução de peixes; o nitrogênio total reflete a toxicidade dos compostos nitrogenados presentes e dá suporte ao crescimento microrganismos, por ser um nutriente essencial; o fósforo total é um macronutriente e participa do processo de eutrofização da água; a turbidez reflete aspectos como erosão das margens e contaminação por esgotos; os sólidos dissolvidos alteram sabor da água, reduzem a penetração de luz e prejudicam a vida aquática.

Segundo dados disponíveis no mapa interativo digital que lista as estações de monitoramento de qualidade de água em operação, que alimentam o Sistema Nacional de Informações sobre Recursos Hídricos (SNIRH, 2018), a região metropolitana de Alagoas possui apenas 20 estações em operação, cobrindo 5 corpos d'água (oito situadas no entorno da Lagoa Mundaú, uma no Rio Mundaú, uma no Rio Paraíba do Meio, oito no entorno da Lagoa Manguaba e duas na Zona dos canais/Boca da Barra). Levando em consideração a quantidade de corpos d'água superficiais em Alagoas, em comparação com o número e distribuição das estações de monitoramento em operação, fica evidente a escassez de dados sobre a qualidade das águas do estado.

As bases legais para o controle de qualidade de água superficial são principalmente as resoluções do Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) e do Conselho Nacional de Recursos Hídricos (CNRH); já no tocante ao

monitoramento da qualidade de águas destinadas para o consumo humano e potabilidade, a regulação é feita pela portaria do Ministério da Saúde nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011.

Neste âmbito, a Agência Nacional das Águas esclarece que a Resolução CONAMA nº 357/2005 dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências; a Resolução CONAMA nº 397/2008 altera o art. 34 da Resolução CONAMA 357/2005 e que a Resolução CNRH nº 91/2008 estabelece os procedimentos gerais para o enquadramento dos corpos d'água superficiais e subterrâneos (ANA, 2018).

No tocante aos contaminantes presentes em água, a portaria de consolidação nº 5/2017 do Ministério da Saúde, em seu anexo XX, tabela 7, traz a lista de substâncias químicas orgânicas e inorgânicas que representam risco à saúde e cujas concentrações devem ser avaliadas para a potabilidade, como também os seus valores máximos permitidos. Alguns metais encontram-se entre as substâncias químicas inorgânicas citadas na lista, enquanto que os pesticidas de uso mais comum no país estão listados entre as substâncias orgânicas constantes nesse anexo.

3.3. Avaliação toxicológica da água

Os milhares de produtos químicos em uso atualmente, sendo muitos deles tóxicos, eventualmente acabam misturados com água e indo parar no meio ambiente através dos efluentes, sejam eles domésticos, industriais, agrícolas, etc. Estes efluentes rotineiramente são despejados a céu aberto ou, mesmo quando destinados aos sistemas de esgoto, acabam chegando aos rios, lagos e mares, muitas vezes sem passarem por nenhum processo prévio de tratamento (BOXALL et al., 2012).

As substâncias químicas presentes nestas misturas complexas, quando em contato com organismos vivos – sejam eles vegetais ou animais, incluindo os seres humanos –, podem ser absorvidas e causar danos aos organismos expostos. A

extensão do dano vai depender das características químicas das substâncias, das suas concentrações, do modo de absorção, da quantidade absorvida, do tempo em que os organismos ficaram expostos e, também, das características fisiológicas dos seres afetados (PERRON et al., 2010). Além disso, os efeitos tóxicos podem dar-se de forma aguda ou crônica, em função do tempo de exposição aos xenobióticos.

Entre as substâncias tóxicas comumente identificadas em estudos de contaminação ambiental, os metais, especialmente os chamados metais pesados (alguns metais são considerados como essenciais, nas concentrações adequadas), estão presentes em diversificados produtos de uso humano, em especial componentes eletroeletrônicos. Metais aparecem também na composição de agroquímicos, em rejeitos de mineração e diversas outras fontes. Estes, quando ionizados, são altamente solúveis (GUO; KANG; FENG, 2017).

A maioria dos metais é capaz de acumular-se em tecidos de animais e plantas – processo conhecido como bioacumulação (CHEN; ZHU; WILKINSON, 2010). Quando não-essenciais ou em concentração maior que a necessária, dentro dos organismos vivos, são capazes de interferir na fisiologia e causar os mais diversos danos, que vão desde prejuízos ao sistema nervoso, até o câncer. O chumbo, por exemplo, apresenta toxicidade neurológica, hematológica e renal para humanos em concentrações que vão de 10 a 40 $\mu\text{g}/\text{dL}^{-1}$ no plasma, de acordo com a agência americana *Agency for Toxic Substances and Disease Registry*– ATSDR (ATSDR, 2015). Dificuldades prévias na análise de substâncias com pouca solubilidade em água, como é o caso dos metais precipitáveis, foram descritas previamente na realização de bioensaios (SCHREIBER et al., 2008).

A agricultura e pecuária ainda são a base econômica de muitas regiões. Neste contexto e em função da proximidade de muitos corpos d'água superficiais com lavouras, outra importante classe de contaminantes tóxicos de água é a de praguicidas. Os pesticidas, em sua gênese, são produzidos com o objetivo de causar a morte de organismos indesejáveis, portanto capazes de causar grandes danos quando introduzidos indevidamente em ecossistemas. Adentram as grandes massas d'água através do vento, das chuvas e de efluentes rurais contaminados (LEHMANN et al., 2018). Alguns pesticidas, como é o caso dos organoclorados,

são, em especial, de grande risco ecológico por sua longa persistência no ambiente enquanto contaminantes (HU et al., 2014).

No estudo da presença de substâncias químicas tóxicas no meio ambiente, análises físico-químicas são importantes na elucidação da identidade do agente contaminante, além da determinação de suas concentrações, embora não sejam suficientes para determinar se uma substância eventualmente detectada nas amostras ambientais é capaz de causar danos aos organismos presentes no local de onde a amostra foi coletada (SCHÄFER et al., 2013). Para esta finalidade, ensaios de exposição, simulando o que ocorreria no meio ambiente, são executados. Estes são os chamados bioensaios de exposição para avaliação toxicológica (ABBAS et al., 2018).

A utilização de amostras reconstituídas em laboratório, feitas contendo as mesmas concentrações de componentes detectadas previamente em amostras ambientais, é uma opção para contornar os problemas observados na testagem de matrizes complexas como são as de origem ambiental, porém há estudos que demonstram discrepâncias significantes entre os efeitos tóxicos de amostras de campo e as versões reconstituídas das mesmas, possivelmente devido à presença de compostos químicos não identificados nas amostras coletadas no campo (MICHIELS et al., 2017), o que demonstra a importância de uma caracterização química adequada das amostras para uma melhor compreensão dos efeitos tóxicos observados nos bioensaios.

Uma grande gama de espécies de bactérias, invertebrados e vertebrados podem ser utilizadas em bioensaios como bioindicadores – organismos capazes de demonstrar os efeitos causados pelas substâncias tóxicas presentes no meio ambiente ou em amostras de origem ambiental –, seja através de ensaios ecotoxicológicos realizados em laboratório, ou mesmo em atividades de biomonitoramento executadas no próprio local de exposição, que geram dados mais fidedignos das condições daquele ambiente (LI et al., 2018; TUIKKA et al., 2011; ZITOVA et al., 2009).

Apesar do modelo vertebrado para ensaios de toxicidade mais comum ainda ser o camundongo/rato, seu uso tem decaído progressivamente, enquanto que os

peixes da espécie *Daniorerio*(Figura 7), conhecidos como zebrafish, têm tido destaque crescente neste tipo de bioensaio (SIPES; PADILLA; KNUDSEN, 2011).

O zebrafish é um peixe tropical, de água doce, que apresenta genoma sequenciado e alta taxa de similaridade genética com humanos; ciclo de vida relativamente rápido – o que permite a realização de estudos nas mais diversas etapas de desenvolvimento em um menor período de tempo, quando comparado a outros modelos –; fecundação externa, que implica em maior facilidade no manejo reprodução dos animais; produção de uma grande quantidade de indivíduos em um único cruzamento; embriões, larvas e órgãos transparentes – o que facilita a visualização dos resultados e dispensa a utilização de equipamentos mais complexos –; além de reconhecimento internacional no campo científico como modelo de testes. As características favoráveis deste modelo animal implicam também em menores custos (SIPES; PADILLA; KNUDSEN, 2011).

Figura 7 – Fotografia de peixes da espécie *Daniorerio*, o zebrafish.



Fonte:O autor.

Internacionalmente, a técnica mais utilizada para avaliação toxicológica de água usando o modelo zebrafish tem sido o *Fishembryoacutetotoxicity (FET) test*, padronizado desde o ano de 2013 pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico – OECD; que usa embriões da espécie *Daniorerio*

(zebrafish) para avaliação de toxicidade na fase embriológica de desenvolvimento deste peixe (OECD, 2013), embora diversas outras metodologias de análise sejam possíveis. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA também possui protocolos padronizados de teste de toxicidade usando a mesma espécie na análise de água (ABNT, 2016).

Entre os efeitos tóxicos, as alterações neurológicas são as primeiras manifestadas em caso de exposição a agentes tóxicos, sendo precedentes aos danos fisiológicos e teciduais, podendo ser verificadas mesmo em baixas concentrações do agente tóxico, através dos seus reflexos sobre o comportamento dos animais expostos. Diversos testes de avaliação de aspectos neurológicos executados historicamente com camundongos/ratos – como agressividade, ansiedade e memória– já foram adaptados para serem realizados usando-se o modelo zebrafish (RESENDE; SOCCOL, 2015).

Em bioensaios que avaliam a influência de contaminantes químicos tóxicos presentes em sistemas aquáticos sobre a atividade neurológica-comportamental de peixes, o estudo do comportamento de nado é um ponto chave, pois tem impacto direto sobre a interação social, reprodução e capacidade de evitar e fugir de predadores; sendo estes aspectos comportamentais extremamente importantes do ponto de vista ecológico (CHAULET, 2018). Fatores como aceleração, velocidade média e distância percorrida são considerados na avaliação da capacidade locomotora de peixes (MARTINEZ; VIANA; FARIA, 2011).

4. METODOLOGIA

As análises físico-químicas e microbiológicas foram realizadas junto ao Laboratório do Instituto do Meio Ambiente de Alagoas (IMA/AL), sob gerência do Sr. Manoel Messias dos Santos, em decorrência de parceria técnico-científica entre este órgão estadual e o Laboratório de Toxicologia do Instituto de Ciências Farmacêuticas, sob coordenação dos Professores doutores Maria Aline Barros Fidelis de Moura e José Rui Machado Reys, da Universidade Federal de Alagoas.

4.1. Coleta

A coleta de água em áreas de proteção ambiental foi autorizada pelo órgão responsável por estas reservas, o IMA/AL, através do ofício de anuência nº 05/2018 (Anexo 1). As coletas foram realizadas na segunda metade do mês de novembro do ano de 2018. As coordenadas do ponto de coleta no Rio Pratagy foram 9°31'45.23", 35°41'25.06", enquanto que na barragem do Catolé as coordenadas foram 9°56'07.44", 35°79'64.46".

As amostras ambientais de água superficial foram coletas de três pontos de amostragem situados nas proximidades das estações de captação da CASAL, em garrafas plásticas de 2 litros fornecidos pelo IMA/AL e transportados em sequência, protegidos da luz, em caixa térmica, diretamente para o Laboratório de Estudos Ambientais deste instituto, para as análises físico-químicas preliminares. O *kit* utilizado para coleta e transporte é mostrado na figura 8.

Figura 8 – Fotografia do *kit* para coleta e transporte cedido pelo IMA/AL.



Fonte:O autor.

As coletas de água tratada foram realizadas a partir de torneiras localizadas em áreas públicas e em residências, com autorização por escrito dos proprietários (modelo em anexo), quando advindas de propriedades privadas. Na parte alta da cidade, as amostras de água cloradas foram obtidas na Praça Colina dos Eucaliptos (Bairro de Santa Amélia, localização: 9°.58'61.16", 35°.77'60.70") e, na parte baixa da cidade, em uma residência localizada no Largo São Pedro (Bairro da Levada, localização:9°35'37.0", 35°45'12.0). O acondicionamento e transporte foi feito da mesma maneira que as amostras ambientais.

No caso das águas tratadas, os pontos de coleta foram definidos aleatoriamente dentro da área de abrangência de cada subsistema de tratamento/distribuição de água de interesse, apenas com a exigência que as

torneiras fossem ligadas diretamente ao sistema de distribuição da capital, sem o intermédio de passagem por reservatórios privados, como caixas d'água domésticas.

As amostras para análise microbiológica foram coletadas em frascos de vidro (capacidade de 125 mL) autoclavados, envoltos em proteção contra luminosidade (papel alumínio), contendo duas gotas (0,1 mL) de uma solução a 10% do agente conservante tiosulfato de sódio. O transporte foi feito em caixa térmica e o semeio e incubação deu-se no mesmo dia. No caso das amostras cloradas para fins microbiológicos, as torneiras foram limpas com solução de hipoclorito sódico 100mg/L antes do preenchimento dos frascos e a amostra foi colhida após 2 minutos de fluxo d'água.

Amostras para análise de contaminantes potencialmente tóxicos foram armazenadas em frascos estéreis de plástico de 500 mL e congeladas em freezer de temperatura ajustável (Consul[®], modelo CHB53EB) a -20°C para conservar as suas características originais até as análises posteriores. O transporte foi feito através de avião, em caixas de isopor seladas, até os laboratórios parceiros localizados na região Sudeste. As amostras utilizadas na análise por ICP-MS foram previamente filtradas e acidificadas com 2 mL de solução de ácido nítrico a 1%.

Todas as coletas foram feitas manualmente, portando os Equipamentos de Proteção Individual adequados.

4.2 Análise Físico-química preliminar

4.2.1 Condutividade elétrica, salinidade potencial de hidrogênio (pH), oxigênio dissolvido (OD) e temperatura

A determinação da condutividade, salinidade, pH e OD foi realizada por potenciometria. A análise foi realizada à temperatura de 25 °C, com medidor multiparâmetro (pH, condutividade, salinidade, oxigênio dissolvido e temperatura) CDS107 da marca Omega[®]. Antes da medição utilizou-se as soluções-

padrão fornecidas juntamente com o aparelho (solução de KCl, 1413 $\mu\text{S}/\text{cm}$ a 25 °C) para calibrar o eletrodo.

Inicialmente, um pequeno volume da amostra foi acondicionado em um béquer limpo, então a sonda (sensor) foi mergulhada na amostra e o resultado observado no visor do aparelho. Antes e após a medição os eletrodos foram limpos com água deionizada.

O resultado da condutividade foi expresso em microsiemens por centímetro ($\mu\text{S}/\text{cm}$); a salinidade foi expressa em porcentagem (%) de sais dissolvidos na amostra, enquanto que o oxigênio dissolvido foi expresso na forma de mg/L de O_2 . A temperatura foi expressa na escala Celsius.

4.2.2 Turbidez

Utilizou-se Turbidímetro kr2000 da marca Akrom[®], que possui um diodo emissor de infravermelho (850 nm) e um detector de fotodiodo de silício. O resultado foi expresso em unidades de turbidez (UT).

A calibração foi feita previamente com padrão fornecido junto com o aparelho. Uma pequena porção da amostra foi acondicionada em cubeta de vidro, até o limite indicado na mesma. A cubeta foi colocada no interior da câmara escura do aparelho para leitura.

4.2.3 Sólidos Dissolvidos Totais (SDT)

A amostra foi homogeneizada e mediu-se 100 mL com o auxílio de uma pipeta volumétrica. Em seguida, este volume passou um sistema de filtração a vácuo, através de um filtro de fibra de vidro.

O filtrado foi transferido para uma cápsula de porcelana seca e previamente pesada, então procedeu-se a evaporação da amostra em estufa (105 °C) por uma hora. Após a evaporação e resfriamento natural da cápsula, pesou-se novamente em balança analítica a mesma. Por fim, foi calculada a diferença do peso da cápsula usando-se os valores obtidos antes e depois da evaporação da amostra, então o

valor obtido foi usado para cálculo da concentração dos sólidos dissolvido inicialmente na amostra, sendo expressa em mg/L.

4.2.4 Cor aparente

A determinação da cor foi realizada através do método de determinação por disco comparador colorimétrico, onde a amostra é colocada em uma cubeta e sua cor é comparada com a de discos de vidro que são previamente calibrados com as cores da escala Platino-Cobalto. O resultado foi expresso em unidades Hazen (H), que é representada por 1 mg de platina em 1 litro de água, na forma de cloroplatina de cobalto a 1 ppm de platina.

4.2.5 Dureza total

Realizada através de titulometria. Inicialmente, 100 mL da amostra foram acondicionadas em um Erlenmyer de 250 mL, então adicionou-se 2 mL de hidróxido de sódio 1 mol/L (NaOH), com pipeta graduada. Agitou-se e então foi adicionado 0,2 g do indicador murexida, que deixa a solução rósea. Nesse ponto é feita a titulação com solução de EDTA 0,01 M, agitando-se continuamente até o surgimento da cor púrpura – ponto final da titulação. O volume de EDTA gasto foi anotado e, em seguida, foi feito o seguinte cálculo:

$$\text{Dureza de Ca}^{2+} \text{ em mg/L de CaCO}_2 = \frac{\text{volume gasto de EDTA} \times \text{fc} \times 1000}{\text{mL da amostra}} \times 0,4008$$

Onde fc representa o fator de correção da solução de NaOH.

4.2.6 Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO)

Teste realizado de acordo com a Norma Técnica Interna nº 03 da SABESP, de 1997 (esquematizada no Anexo 3), pelo método “DBO sem semente”, onde é

medido o oxigênio dissolvido na amostra ao início do teste e ao final do tempo de incubação, e posteriormente é realizado o cálculo da DBO.

O cálculo de DBO é feito de acordo com a fórmula:

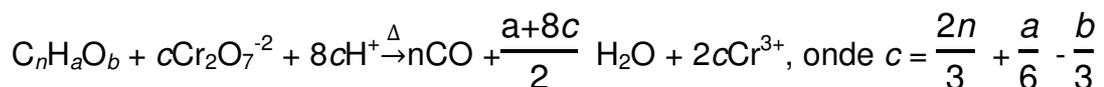
$$\text{DBO (mg O}_2\text{/L)} = \frac{\text{OD}_i - \text{OD}_f}{\rho}$$

Onde ρ é a fração volumétrica decimal da amostra – calculada como volume (mL) de amostra introduzido no frasco para DBO, dividido pelo volume total (mL) do frasco para DBO.

4.2.7 Demanda Química de Oxigênio (DQO)

Ensaio executado de acordo com a Norma Técnica Interna nº 04 da SABESP (1997), através do método “B” de determinação de DQB, que é indicado para águas brutas em geral, com ausência de poluição elevada por esgoto.

Um agente oxidante forte em excesso, o dicromato de potássio, foi usado para oxidar a matéria orgânica presente na amostra, em condições ácidas, de acordo com a seguinte reação geral:



Ao fim da reação, uma titulação (pelo sulfato ferroso amoniacal) foi feita para determinar a quantidade de dicromato não consumida e, por fim, foi calculado o DQO pela fórmula:

$$\text{DQO (mg O}_2\text{/L)} = \frac{(A - B) \times M \times 8000}{V}$$

Mais detalhes sobre o procedimento estão disponíveis em anexo (Anexo 4) ou consultando-se diretamente a referência citada.

4.2.8 Nitrogênio amoniacal total

A análise de nitrogênio na forma amoniacal presente na amostra foi realizada através de destilação seguida de titulação, com pequenas adaptações (descritas abaixo) da metodologia padronizada pela EMBRAPA para análise de compostos nitrogenados em água e solo (Silva, 2010).

Adicionou-se à amostra 25 mL de solução tampão de borato (9,5 g de tetraborato de sódio e 176 mL de hidróxido de sódio 0,1 mol/L em balão de 2 litros completado com água destilada), depois o pH foi ajustado para 9,5 usando-se solução de hidróxido de sódio 0,1 mol/L.

A amostra preparada foi, então, transferida para um frasco Kjeldahl, para destilação, que foi executada conforme o determinado na metodologia supracitada da EMBRAPA.

Após a destilação, o destilado foi titulado contra a solução de Ácido Sulfúrico 0,01 mol/L. O ponto final da titulação foi considerado como o ponto de pH igual ao pH da solução padrão de ácido bórico preparada como 20 g de ácido bórico e 10 mL de indicador misto para 1 litro de água.

A concentração de nitrogênio amoniacal na amostra foi dada pela fórmula:

$$\text{mgN-NH}_3/\text{L} = \frac{\text{volume } A \times 280}{\text{volume de amostra}}$$

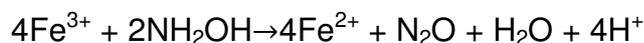
Onde “*Volume A*” corresponde ao volume de ácido sulfúrico 0,01 mol/L gasto na titulação.

4.2.9 Ferro Total

Ensaio executado de acordo com a Norma Técnica Interna nº 10 da SABESP (2001), usando o método de determinação através da 1,10-Fenantrolina.

Inicialmente foi preparada uma curva de calibração usando-se uma solução padrão de ferro, então as amostras foram acidificadas com ácido clorídrico para

solubilizar o ferro e tratadas com 1,10-Fenantrolina, que forma complexos vermelho-alaranjados com o ferro, de acordo com a equação abaixo:



Após a formação da cor, foi feita leitura em espectrofotômetro a 510 nm. O cálculo final da concentração de ferro seguiu a fórmula: $\text{mg Fe/L} = (A - B) \times F$ (onde A = leitura da amostra em absorbância; B = leitura do branco em absorbância; F = fator da curva de calibração). Detalhes do procedimento, como concentrações dos reagentes e preparo da curva de calibração, encontram-se na metodologia detalhada em anexo (Anexo 5).

4.2.10 Cloreto

O teste seguiu o protocolo padronizado pela ABNT (1997), na NBR 13797/97, optando-se pelo método “Nitrato de Mercúrio II”, que é indicado para amostras com um baixo teor de cloreto esperado (concentrações menores que 100mg Cl-/L). A metodologia completa encontra em anexo (Anexo6).

Ao final, segundo a metodologia anteriormente citada, a concentração de cloretos na amostra é dada pelo seguinte cálculo: $\text{mg Cl-/L} = \frac{(V_a - V_b) \times N \times f_c \times 35450}{\text{mL da amostra}}$

Onde V_a é o volume (mL) de solução de nitrato de mercúrio gastos para titular a amostra; V_b é o volume (mL) de solução de nitrato de mercúrio gastos para titular prova em branco; N representa a normalidade da solução de nitrato; f_c é fator de correção do nitrato de mercúrio.

4.2.11 Sulfato

A determinação de sulfatos foi feita precipitando-se o sulfato, em presença de HCl, a sulfato de bário, pela adição de cloreto de bário à solução.

Posteriormente o precipitado foi filtrado em um cadinho de porcelana previamente tarado, e, em seguida, aquecido a altas temperaturas (>100°C) em

estufa para secagem. Após resfriamento, o cadinho foi novamente pesado e, por diferença de peso, calculou-se a massa de sulfato presente na amostra. Cálculo utilizado:

$$\text{mg SO}_4^{2-}/\text{L} = \frac{(p_2 - p_1) \times 411,6}{\text{volume de amostra}}$$

4.3. Análise microbiológica

Realizadas no Laboratório de Estudos Ambientais do Instituto do Meio Ambiente de Alagoas (IMA/AL), a quantificação de coliformes totais, coliformes termotolerantes e *E. coli* foi feita através da técnica de Fermentação em Tubos Múltiplos, cujo resultado é expresso na forma de Número Mais Provável NMP/100 mL, conforme preconizado pela legislação específica e de acordo com o Ministério da Saúde (FUNASA, 2013).

Na análise de coliformes totais, inicialmente foi realizado um teste presuntivo, para determinar se havia presença ou não de coliformes, e, confirmada a presença, um teste confirmatório foi realizado através da inoculação, com auxílio de alça de platina previamente flambada, em meio verde brilhante.

De 15 tubos de ensaio, em cinco deles foi colocado caldo lactosado de concentração dupla e, nos demais, caldo lactosado de concentração simples. Nos primeiros cinco tubos foram inoculados, com pipeta esterilizada, 10 mL da amostra (diluição 1:1); em cinco tubos com caldo de concentração simples foi inoculado 1 mL da amostra (diluição 1:10) e nos últimos cinco tubos com caldo da mesma concentração foi inoculado 0,1 mL da amostra (diluição 1:100).

Após as inoculações, os tubos foram agitados para que ocorresse a homogeneização do seu conteúdo e, em seguida, eles foram incubados a $35^\circ \pm 0,5^\circ$ C durante 24/48 horas em estufa. Ao final do tempo determinado, os tubos onde houve formação de gás foram considerados positivos e encaminhados para o teste confirmatório, onde passavam por nova incubação idêntica em estufa.

A análise de coliformes termotolerantes deu-se de maneira semelhante aos coliformes totais, com a diferença de que o meio de inoculação utilizado foi o meio

EC, mais específico para coliformes termotolerantes, e temperatura de incubação em estufa mais elevada, em torno de 44°C. Quando à *E. coli*, o semeio foi realizado neste mesmo meio, sendo a sua diferenciação feita através da observação de fluorescência azul sob lâmpada ultravioleta, no comprimento de onda 365 nm.

A determinação do NMP foi dada pela combinação de tubos positivos obtida no ensaio, que é confrontada com a tabela referência da disponível no anexo 7, onde cada combinação de tubos possível é associada a um respectivo NMP. Detalhes sobre a preparação dos caldos utilizados podem ser encontrados na referência citada.

4.4. Determinação do Índice de Qualidade da Água- IQA

Sendo considerado o principal indicador de qualidade de água utilizado no país (CETESB, 2014), a metodologia adotada para cálculo do Índice de Qualidade da Água - IQA seguiu o proposto pela Agência Nacional das Águas (2018):

O cálculo do IQA é feito por meio do produtório ponderado dos nove parâmetros, segundo a seguinte fórmula:

$$IQA = \prod_{i=1}^n q_i^{w_i}$$

Onde: IQA = Índice de Qualidade das Águas, um número entre 0 e 100; q_i = qualidade do i -ésimo parâmetro. Produtório: Um número entre 0 e 100, obtido do respectivo gráfico de qualidade, em função de sua concentração ou medida (resultado da análise); w_i = peso correspondente ao i -ésimo parâmetro fixado em função da sua importância para a conformação global da qualidade, isto é, um número entre 0 e 1, de forma que:

$$\sum_{i=1}^n w_i = 1$$

Sendo n o número de parâmetros que entram no cálculo do IQA. (ANA, 2018)

Na qual, inicialmente foi realizado o cálculo ponderado dos parâmetros individuais e posteriormente os valores obtidos foram aplicados na fórmula do IQA. Os pesos (w) adotados para cada parâmetro encontram-se expressos no quadro 2,

enquanto queo “Anexo 8” traz os gráficos com as médias de cada parâmetro, para a atribuição dos respectivos valores de qualidade (q).

Quadro 2 – Pesos atribuídos aos parâmetros usados na somatória do IQA.

PARÂMETRO DE QUALIDADE	PESO (w)
Oxigênio dissolvido	0,17
Coliformes termotolerantes	0,15
Potencial hidrogeniônico - pH	0,12
Demanda Bioquímica de Oxigênio - DBO	0,1
Temperatura da água	0,1
Nitrogênio total	0,1
Fósforo total	0,1
Turbidez	0,08
Resíduo total	0,08
Total:	1

Fonte: ANA, 2018.

4.5 Identificação e quantificação de micropoluentes tóxicos

4.5.1 Metais e íons inorgânicos

A análise de contaminação por substâncias químicas inorgânicas foi executada no Laboratório de Mutagênese *in vitro* e *in vivo*, do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, por meio de cooperação com o mestre em Biologia Vegetal Edvar Junior Roncetti Coelho.

O ensaio para análise de metais e outros íons inorgânicos seguiu metodologia proposta por Beck, Franks e Bruland (2002), através da técnica de Espectrometria de Massa com Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-MS). Os agentes químicos selecionados para análise foram arsênio, chumbo, cádmio, mercúrio, alumínio, titânio, estanho, tungstênio, cromo, zinco, ferro, cobalto, manganês, níquel, cobre e silício.

A tabela seguinte sumariza os parâmetros experimentais adotados neste ensaio.

Tabela 1 – Parâmetros adotados na análise por ICP-MS.

Instrumento	Finnigan MAT - Element ICP-MS
Câmara de spray	Glass ExpansionCinnibar
Nebulizador	Glass ExpansionCinikal
Potência incidente	1250 W
Cones	Nickel, Spectron Inc.
Fluxo de plasma	131 min ⁻¹
Fluxo de gás auxiliar	0,751 min ⁻¹
Fluxo de gás nebulizador	0,85-0,951 min ⁻¹
Fluxo de nebulização da amostra	1,0 ml min ⁻¹
Autosampler	CETAC ASX-100
Coluna	
Resina quelante	Toyopearl AF-Chelate-650 M
Coluna com amostra	Global FIA (MC-ICNM)

Fonte: Adaptado de BECK; FRANKS; BRULAND, 2002 para o ensaio.

4.5.2 Pesticidas

A determinação de contaminação por pesticidas foi executada no Laboratório de Toxicologia, do Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana da Fundação Oswaldo Cruz – CESTEH/FIOCRUZ/RJ, com laudos técnicos das análises emitidos pelo setor executor.

A determinação e quantificação de pesticidas foi feita de acordo a metodologia estabelecida por Benfenati et al (1990), através da técnica de Cromatografia Gasosa acoplada à detector de Espectrometria de Massa (GC-MS/MS). O procedimento é iniciado com uma extração em fase sólida realizada em coluna C18 (15 mm de diâmetro por 15 cm de comprimento), onde os compostos orgânicos são eluídos com diclorometano. Em seguida, o extrato é injetado no equipamento de GC-MS/MS.

Os compostos orgânicos de atividade pesticida selecionados para análise englobam as substâncias preconizadas pelo Ministério da Saúde na portaria de consolidação 05/2017 (Quadro 3), além dos outros pesticidas, de uso menos difundido, listados a seguir: acefato, acetamiprida, acetoclor, ametrin, azinfos-metil, azoxistrobin, bifentrina, aletrin, boscalid, captan, carboxin, etil-carfentrazone, cifenotrina, ciflutrina, cipermetrina, ciproconazol, clorfenvinfos, clortalonil, deltametrin, diazinon, diclorvos, dicofol, difenoconazol, dimetoato, disulfoton, epoxiconazol, esfenvalerato, etion, etofenprox, fenitrothion, fenotrin, fenpropatrin, danitol, fention, fentoato, fenvalerato, fipronil, flutriafol, folpet, imidan, clordano, heptacloro, hexaclorobenzeno, imiprotrina, cresoxim, lactofen, cialotrin, malaoxon, malation, metamidofos, metamidron, metidation, metoxicloro, metribuzin, mirex, monoclotofos, oxifluoreno, paraoxon, PCB, hexaclorobife, heptaclorobife, triclorobifeno, tetraclorobifeno, pentacloroanisol, picoxstrobin, piraclotrobin, pirimetanil, pirimifosmetil, piriproxifen, procimidona, profenofos, propanil, tebuconazol, terbufos, tetraconazol, nonaclor, triazofos, trifenilfosfato e trifloxistrobin.

A lista dos pesticidas analisados que são preconizados pelo Ministério da Saúde encontra-se no quadro a seguir, juntamente com os limites de detecção e quantificação verificados para cada analito. O limite de detecção para os demais

pesticidas selecionados para análise foi de $0,2 \mu\text{g.L}^{-1}$ e o limite de quantificação para os mesmos foi de $0,5 \mu\text{g.L}^{-1}$.

Quadro 2 – Relação de pesticidas preconizados pelo Ministério da Saúde e seus limites de detecção e quantificação para o ensaio realizado.

Pesticida	Limite de Detecção ($\mu\text{g/L}$)	Limite de Quantificação ($\mu\text{g/L}$)
Alacloro	0,07	0,3
Aldrin + Dieldrin	0,2	0,5
Atrazina	0,04	0,2
Clordano	0,003	0,05
Clorpirifós	0,07	0,3
Endossulfan	0,2	0,5
Endrin	0,2	0,5
gama-HCH	0,006	0,03
Metolacoloro	0,2	0,5
Metil Paration	0,04	0,2
DDT Total (DDT+DDE+DDD)	0,002	0,01
Pendimetalina	0,03	0,1
Permetrina	0,04	0,2
Simazina	0,08	0,4
Trifluralina	0,2	0,5

4.6 Bioensaios com zebrafish para avaliação de toxicidade *in vivo*

Os ensaios usando o modelo animal zebrafish (*Danio rerio*) foram aprovados pelo Comitê de Ética sobre o Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Alagoas, através do parecer registrado sob o número 72/2017 e com certificado de autorização (Anexo 2) emitido em 27 de fevereiro de 2018, com vigência até 30 de agosto de 2019.

A toxicidade avaliada nos ensaios foi do tipo aguda, na modalidade neurológica/comportamental, optando-se pela adoção de peixes no estado adulto de desenvolvimento, com aproximadamente 3 meses de idade cada.

A realização dos bioensaios foi realizada no laboratório de Imunologia da Unidade Laboratorial de Análises Clínicas - ULAC do Hospital Universitário Professor Alberto Antunes – HUPAA/UFAL, que dispõe de sistema de filtração de água e controle de ar, ambos necessários à realização dos ensaios. O Laboratório de Imunologia é coordenado pelo Farmacêutico Orlando Ronaldy da Silva Santos, autor desta dissertação. A Unidade de Laboratórios (ULAC) a qual pertence o Laboratório de Imunologia estava, no período de execução dos ensaios, sob responsabilidade técnica geral do Farmacêutico Esp. Péricles Melo e Silva.

No período anterior aos bioensaios (10 dias de aclimação), os peixes foram mantidos nas seguintes condições: aquário de vidro de 5 litros; alimentação realizada duas vezes ao dia, sendo às 08:00 e às 16:00 horas, composta de ração seca (Ração JBL Novo Bits); em água tratada proveniente de equipamento deionizador, com controle do pH realizado com o kit Nutratec Tampão Ph 7,0 100g Buffer Tamponador para aquário doce; controle da amônia tóxica feito com o kit Teste Alcon Amônia Tóxica Doce; lotação máxima de 20 peixes por 5 litros do aquário; aeração da água promovida por compressor, de vazão controlada, ligado a um sistema de filtração mecânica, constituído por filtro de material esponjoso acoplado a uma coluna de carvão ativado (material adsorvente); controle de temperatura por condicionador de ar regulado para 25 °C.

O ensaio de exposição foi baseado na metodologia de análise por videomonitoramento conduzida por Riehl et al (2011), com modificações especificadas abaixo.

Foram usados tanques de plástico fosco de 2 litros para os grupos controle e teste, tendo em vista que o reflexo dos aquários de vidro é prejudicial na análise posterior das imagens pelo *software* selecionado. Estes tanques foram preenchidos até a sua metade (1 litro) com a solução controle (água deionizada) ou solução teste (amostra ambiental). Após transferidos para os tanques de plástico com auxílio de uma rede, os peixes ficaram em repouso por 30 min para aclimação ao novo ambiente aquático e recuperação do *stress* induzido pela transferência, antes do acionamento da câmera. Os registros de imagem foram realizados nos momentos de 0, 6, 12 e 24 horas após a exposição. Os animais não foram alimentados durante os testes.

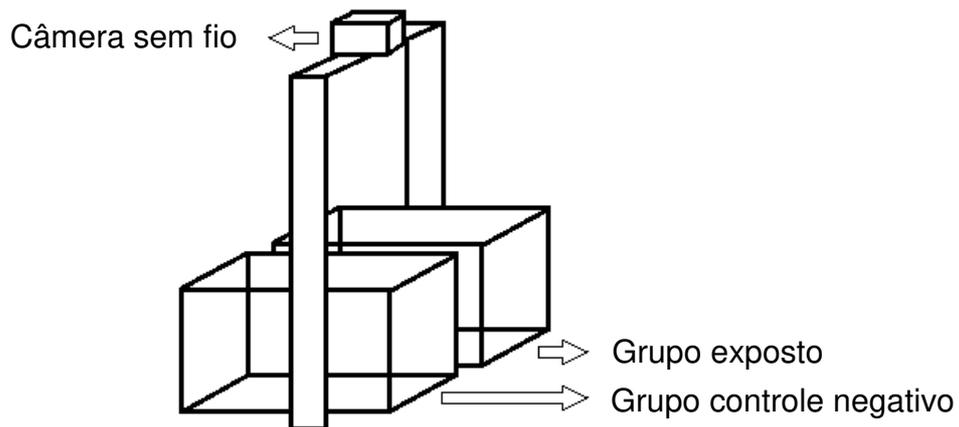
Por conta da limitação imposta pelo CEUA quanto ao número de animais a ser utilizado neste estudo (10 machos e 10 fêmeas), o *n* foi reduzido para 5 animais no grupo controle negativo e 5 no grupo de expostos, sendo avaliada apenas a toxicidade *in vivo* da fonte de água identificada como tendo o menor IQA – a barragem do Catolé –, de acordo com número de espécimes disponíveis. A distribuição de machos e fêmeas entre os grupos foi aleatória. Os testes foram realizados em triplicata, com tempo de cerca de 24 horas de pausa entre as observações independentes, totalizando o uso de 20 animais (3x5 de expostos + 1x5 do controle).

A análise das imagens obtidas foi realizada através do software de código aberto ToxTrac (RODRIGUES et al, 2018), que possui um robusto algoritmo de *tracking* capaz de identificar e acompanhar múltiplos animais simultaneamente, e que conta com análise estatística nativa e representação gráfica de resultados (detalhes sobre o sistema de *tracking* e análise estatística estão descritos em RODRIGUES et al, 2017). Os vídeos capturados no período pós-exposição tiveram duração de 6 minutos, conforme o estabelecido na metodologia referenciada anteriormente.

A câmera utilizada para o videomonitoramento foi uma Samsung® NX200, que conta com sensor APS-C CMOS de 20.3 MP, lente de 18-55mm e conexão *wireless* para pareamento com o computador usado no processo análise das imagens. A câmera foi acoplada a um suporte simples de madeira que passa sobre os aquários,

numa altura de aproximadamente 45 cm, suficiente para captar simultaneamente em vídeo o grupo controle e o grupo-teste, como mostrado no esquema a seguir:

Figura 9 – Representação esquemática do *design* adotado para ovideomonitoramento, demonstrando a disposição dos tanques que possibilitou a gravação simultânea, em vídeo, do grupo exposto e do grupo controle, nos bioensaios.



Fonte. O autor.

4.7 Tratamento estatístico

Os laudos emitidos pelo IMA/AL para as análises físico-químicas e microbiológicas preliminares contam com as faixas de linearidade respectivas a cada ensaio, calculadas de acordo com os padrões estabelecidos na legislação vigente (RDC nº 166/2017 da ANVISA) para a validação de métodos analíticos.

As análises de metais, pesticidas e os ensaios *in vivo* foram realizados em triplicata, para garantir confiabilidade estatística.

Os dados obtidos nos ensaios de exposição foram submetidos a teste de normalidade (Shapiro-Wilk, para $\alpha=0,05$) para definir qual modelo estatístico seria usado. Confirmada a distribuição normal, a significância ($P < 0,05$) da diferença entre os grupos controle e teste foi avaliada através do teste *t*, de Student. Os gráficos de distribuição normal encontram-se no anexo 9.

Os cálculos de média, frequência e desvio padrão foram realizados com auxílio do Microsoft Excel® (versão 2016) e do programa de código aberto ToxTrac (versão

3.1, 2018), ao passo que os testes de normalidade e significância foram executados através do software Prism® (versão 8.1.1, 2018).

5 RESULTADOS

5.1 Análise Físico-química preliminar

5.1.1 Barragem do Catolé

A análise físico-química preliminar permitiu inferir se as amostras de água analisadas atendem aos requisitos mínimos exigidos pela Resolução do CONAMA nº 357/2015 e Portaria 5/2017 do Ministério da Saúde, conforme o tipo de amostra – bruta ou potável. Os resultados obtidos demonstram que a água coletada da barragem do Catolé não atende a todos os pré-requisitos para ser enquadrada no tipo “Água Doce de Classe 2”, estando a sua turbidez acima dos limites aceitáveis definidos pelo CONAMA (até 100 UT). Os demais parâmetros encontram-se em conformidade com o estabelecido nesta legislação.

Tabela 2 –Resultados das análises físico-químicas preliminares referentes ao Catolé.

Tipo da amostra	Parâmetro	Resultado	Referência	Expresso em	Linearidade (%)
BRUTA					
	pH	7,05	NE	-	98
	Turbidez	109,3	até 5,0	UT	-
	Salinidade	0,2	NE	%	98
	Condutividade	403,4	NE	µs/cm	-
	OD	5,2	> 5,0	mg/L O ₂	100
	DQO	41,76	NE	mg/L O ₂	102
	DBO	2	até 5,0	mg/L O ₂	100
	N amoniacal Total	0,48	Até 8,7	mg/L N	-
TRATADA					
	pH	4,33	de 6,0 a 9,0	-	101
	Turbidez	< 0,01	até 5,0	UT	100
	Salinidade	0,1	NE	%	-
	Cor aparente	8,61	até 15,0	uH	99
	Dureza total	42,25	até 500,0	mg/L CaCO ₃	100
	SDT	185	até 1000	mg/L	-
	Nitrato	4,18	até 10,0	mg/L N	97
	Nitrito	< 0,01	até 1,0	mg/L N	98
	Cloro Residual Livre	1,95	de 0,2 a 2,0	mg/L Cl ₂	-
	Ferro Total	0,14	até 0,3	mg/L Fe	98
	Sulfato	35,68	até 250,0	mg/L SO ₄	98

NE = Não expresso na legislação.

A água proveniente do Catolé apresentou melhora na sua qualidade após processo de tratamento, atendendo às especificações legais de potabilidade. No entanto, o valor de pH obtido nas análises está em desacordo com a recomendação expressa na Portaria nº 518/2004 do Ministério da Saúde, que preconiza que o pH da água usada para esta finalidade seja mantido entre 6,0 a 9,0 após a etapa de tratamento.

5.1.2 Rio Pratygy

Todos os parâmetros avaliados nas amostras referentes ao Rio Pratygy, com exceção da salinidade, foram considerados satisfatórios para o seu uso dentro da classificação de “Águas doces de Classe 2”, porém, devido ao percentual relativamente elevado de sais na amostra, a sua classificação mais adequada é como água salobra, segundo a resolução do CONAMA nº 357/2015.

Tabela 3 – Resultados das análises físico-químicas referentes ao Rio Pratygy.

Tipo da amostra	Parâmetro	Resultado	Referência	Expresso em	Linearidade (%)
BRUTA					
	pH	7,61	NE	-	98
	Turbidez	4,3	até 5,0	UT	-
	Salinidade	2,31	NE	%	98
	Condutividade	42,02	NE	µs/cm	-
	OD	6,21	> 5,0	mg/L O ₂	100
	DQO	31,14	NE	mg/L O ₂	102
	DBO	2	até 5,0	mg/L O ₂	100
	N amoniacal Total	0,48	Até 8,7	mg/L N	-
TRATADA					
	pH	4,33	de 6,0 a 9,0	-	101
	Turbidez	< 0,01	até 5,0	UT	100
	Salinidade	0,1	NE	%	-
	Cor aparente	< 0,04	até 15,0	uH	99
	Dureza total	58,74	até 500,0	mg/L CaCO ₃	100
	SDT	144	até 1000	mg/L	-
	Nitrato	2,35	até 10,0	mg/L N	97
	Nitrito	< 0,01	até 1,0	mg/L N	98
	Cloro Residual Livre	< 0,01	de 0,2 a 2,0	mg/L Cl ₂	-
	Ferro Total	0,14	até 0,3	mg/L Fe	98
	Sulfato	56,26	até 250,0	mg/L SO ₄	98

NE = Não expresso na legislação.

O processo de tratamento empregado pela CASAL foi eficiente em reduzir a salinidade das águas do Rio Pratagy, sendo estas, ao fim, adequadas para abastecimento da população e em acordo com os padrões de potabilidade exigidos. O seu pH, no entanto, está abaixo do ideal para águas em processo de distribuição.

5.2 Análise microbiológica

Quanto ao teor de coliformes, tanto as amostras de água em estado bruto do Rio Pratagy como as da Barragem do Catolé atenderam aos padrões de qualidade do CONAMA para o uso que se destinam. O mesmo foi observado para as amostras de águas coletadas após passagem pelo processo de tratamento.

Tabela 4 – Resultados das análises microbiológicas referentes ao Catolé e ao Pratagy.

Tipo da amostra	Parâmetro	Resultado	Referência	Expresso em	Linearidade (%)
-----------------	-----------	-----------	------------	-------------	-----------------

		Catolé	Pratagy			
BRUTA						
	Coliformes fecais	790	230	Até 1000 NMP/mL	NMP/100 mL	95
TRATADA						
	Coliformes totais	< 0,01	< 0,01	0	NMP/100 mL	95
	<i>E. coli</i>	< 0,01	< 0,01	0	NMP/100 mL	95

O processo de tratamento executado pela CASAL foi extremamente bem-sucedido na redução do número de bactérias de origem fecal observado nas amostras coletadas em estágio pré-tratamento, provenientes dos dois corpos d'água em estudo, tornando-as adequadas ao consumo humano e preparo de alimentos.

5.3 Índice de Qualidade da Água

Os valores obtidos de IQA final para as amostras de água bruta provenientes da Barragem do Catolé e do Rio Pratagy enquadram-se nas categorias “Razoável” e “Boa”, respectivamente, segundo a classificação adotada no estado de São Paulo, onde localiza-se a CETESBE (2014), pioneira na adoção de índices de qualidade.

No entanto, os padrões de qualidade adotados no estado de Alagoas são mais rígidos (ANA, 2018), ficando as duas fontes de água classificadas apenas como de qualidade “Ruim” e “Razoável”, segundo a padronização adotada localmente.

Tabela 5 – Resultados do cálculo ponderado dos parâmetros de IQA e IQA final.

Parâmetro IQA	Fonte de água bruta	
	Catolé	Pratagy
	IQA relativo	
Oxigênio Dissolvido	63,8	82,5

Temperatura da Água	92	92
Coliformes Termotolerantes	22,2	32,3
pH	92	92,3
Demanda Bioquímica de O ₂	81,4	81,4
Nitrato	34,5	47,7
Fósforo Total	97,4	72,6
Turbidez	5	86,9
Sólidos totais	75,8	80,5
IQA Final	49,1	68,7

5.4 Identificação e quantificação de contaminantes tóxicos

5.4.1 Metais

Com a exceção de ferro e estrôncio, todos os demais metais de toxicidade relevante foram detectados nas amostras de ambos os corpos d'água, antes e depois do processo de tratamento, embora em baixas concentrações. O Silício foi o elemento encontrado em maior concentração entre os identificados nas amostras.

Em alguns casos o processo de tratamento e distribuição de água não apenas foi ineficaz na redução da concentração desses micropoluentes, como também acarretou no aumento de algumas espécies químicas tóxicas, como arsênio, cobre, chumbo e zinco, nas águas provenientes do Sistema Catolé, e cádmio, cobre, mercúrio, níquel, chumbo, silício e zinco, nas águas coletadas no Rio Pratygy. A tabela 6 traz a relação de todos os íons analisados e as médias das suas dosagens nas amostras.

Tabela 6 – Resultados da quantificação de metais através da técnica de ICP-MS. Quantidades expressas em mg/L.

Metal	Barragem do Catolé		Rio Pratygy		Referência
	Bruta	Tratada	Bruta	Tratada	
Ag	0,00595	0,00069	0,00204	0,00126	NE
Al	0,2004	0,0119	0,02593	0,1461	NE
As	0,00058	0,00189	0,00582	0,00092	Até 0,01
Cd	0,00035	0,00039	0,00025	0,00046	Até 0,005
Co	0,00007	0,00028	0,00042	0,00033	NE
Cr	0,00011	< L.D.	< L.D.	< L.D.	Até 0,05

Cu	0,00082	0,06654	0,00275	0,00582	Até 2,0
Fe	< L.D.	< L.D.	< L.D.	< L.D.	NE
Hg	0,0009	0,0009	0,00088	0,00105	Até 0,001
Mn	0,0252	0,00199	0,00234	0,0333	NE
Ni	0,02897	0,00403	0,00054	0,00833	Até 0,07
Pb	< L.D.	0,00082	0,00075	0,00138	Até 0,01
Sn	< L.D.	< L.D.	< L.D.	< L.D.	NE
Si	4,9318	3,3056	0,73309	5,3606	NE
Ti	0,00143	< L.D.	< L.D.	< L.D.	NE
Zn	0,21132	0,33862	0,06534	0,09219	NE

L.D. = Limite de detecção (2×10^{-7} mg/L = 0,2 ng/L); NE = Não expresso na legislação.

Alguns dos metais que foram selecionados para este estudo de acordo com a sua potencial toxicidade encontravam-se em concentrações tão baixas nas amostras que não foram capazes de serem identificados pelo equipamento de ICP-MS, mesmo este apresentando alta sensibilidade, como foi o caso dos elementos ferro e estrôncio. Nenhum dos metais detectados, entre os que possuem limite tolerável para potabilidade já definido pelo MS, encontrava-se acima dos limites aceitáveis para potabilidade.

5.4.1 Pesticidas

Os dados gerados pelo equipamento de ICP/MS na pesquisa de pesticidas que estão enquadradas na portaria 06/2017 do MS encontram-se na tabela a seguir, enquanto que os resultados referentes aos demais pesticidas pesquisados podem ser vistos em detalhes nos laudos emitidos pela FIOCRUZ/RJ, disponíveis no anexo 11.

Tabela 7 - Resultados da análise de pesticidas por GC-MS/MS.

Pesticida	Catolé		Pratagy		Máximo permitido	Limite de Detecção
	Bruta	Tratada	Bruta	Tratada		
Alacloro	< LD	< LD	< LD	< LD	20 $\mu\text{g.L}^{-1}$	0,07 $\mu\text{g.L}^{-1}$
Aldrin + Dieldrin	< LD	< LD	< LD	< LD	0,03 $\mu\text{g.L}^{-1}$	0,2 $\mu\text{g.L}^{-1}$
Atrazina	< LD	< LD	< LD	< LD	2 $\mu\text{g.L}^{-1}$	0,04 $\mu\text{g.L}^{-1}$

Clordano	< LD	< LD	< LD	< LD	0,2 µg.L ⁻¹	0,003 µg.L ⁻¹
Clorpirifós	< LD	< LD	< LD	< LD	30 µg.L ⁻¹	0,07 µg.L ⁻¹
Endossulfan	< LD	< LD	< LD	< LD	20 µg.L ⁻¹	0,2 µg.L ⁻¹
Endrin	< LD	< LD	< LD	< LD	0,6 µg.L ⁻¹	0,2 µg.L ⁻¹
gama-HCH	< LD	< LD	< LD	< LD	2 µg.L ⁻¹	0,006 µg.L ⁻¹
Metolacoloro	< LD	< LD	< LD	< LD	10 µg.L ⁻¹	0,2 µg.L ⁻¹
Metil Paration	< LD	< LD	< LD	< LD	9 µg.L ⁻¹	0,04 µg.L ⁻¹
DDT+DDE+DDD	< LD	< LD	< LD	< LD	1 µg.L ⁻¹	0,002 µg.L ⁻¹
Pendimetalina	< LD	< LD	< LD	< LD	20 µg.L ⁻¹	0,03 µg.L ⁻¹
Permetrina	< LD	< LD	< LD	< LD	20 µg.L ⁻¹	0,04 µg.L ⁻¹
Simazina	< LD	< LD	< LD	< LD	0,03 µg.L ⁻¹	0,08 µg.L ⁻¹
Trifluralina	< LD	< LD	< LD	< LD	2 µg.L ⁻¹	0,2 µg.L ⁻¹

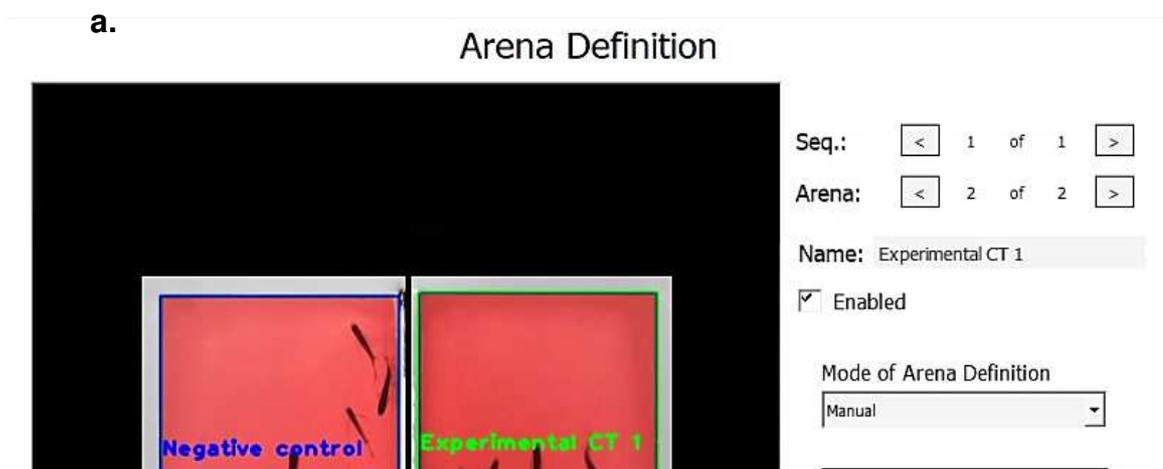
L.D. = Limite de detecção

Apesar dos limites de detecção extremamente baixos, não foram identificados na análise traços de nenhum dos pesticidas selecionados, indicando ausência de contaminação por esses compostos químicos nas amostras testadas.

5.5 Bioensaio com zebrafish

O algoritmo de *trackinganimal* por vídeo contido no *software* adotado, juntamente com a programação de parâmetros específicos realizada em função do *design* planejado para os bioensaios em questão (Figura 10), permitiu uma correta identificação e rastreamento dos espécimes durante a execução dos testes, como pode ser visto na figura 11.

Figura 10 – a. Definição das zonas de *tracking* (arenas) e dos grupos teste e controle. b. Programação de cores e tamanhos para detecção dos animais no vídeo (controle negativo, arena 1, sequência 1).



b. Detection Frame

0

< >

Seq.: < 1 of 1 >

Arena: < 1 of 2 >

0 Object Color Select 135

Min Object Size

Max Object Size

Background Subtraction

Frame Arena **Detection** Detection Filtered

Detected Objects: 5 Sizes: 719.0 - 2145.50

Mean: 1369.5 StDev.: 512.9

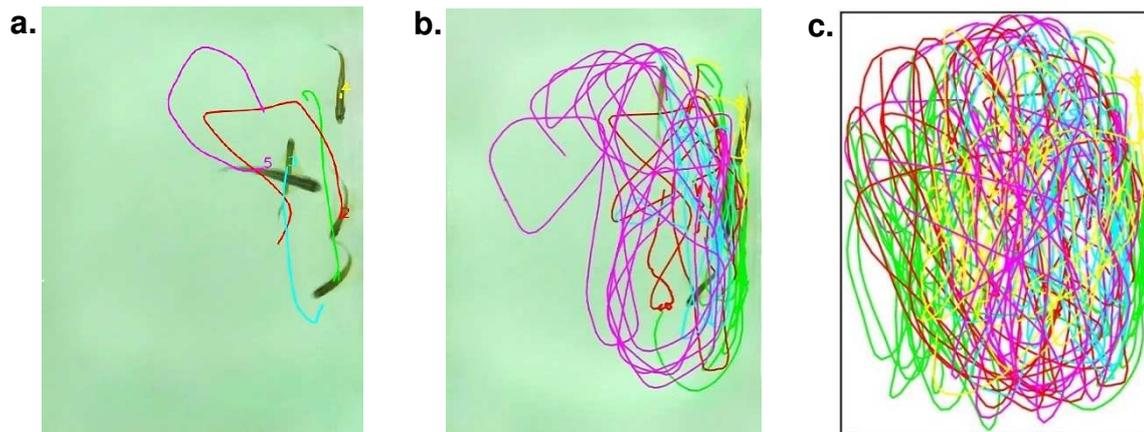
Fonte. Print screens do programa ToxTrac, executado no sistema operacional Windows 10.

Alterações neurológicas comportamentais foram observadas nos indivíduos dos grupos de peixes expostos à água da barragem do Catolé ($P < 0,05$), quando comparados com os indivíduos componentes do grupo controle negativo— que se encontravam imersos em água deionizada por sistema automático de filtragem. Os dados numéricos obtidos a partir do rastreamento dos animais *frame a frame* e posterior cálculo de média por grupo baseada no total de *frames* analisados em cada vídeo, encontram-se evidenciados na tabela 7 e expressos graficamente nas figuras 11 (exceto 11a) e 12, as quais representam uma média dos dados gerados nas três execuções do ensaio.

Tabela 8 – Valores médios obtidos para os parâmetros de motilidade analisados.

Parâmetro Analisado	Tempo (h)	Grupo Controle	Grupo Teste
Velocidade média geral (mm/s) ($P = 0,0003$)	0	71,16	384,97
	6	123,03	385,14
	12	125,54	501,71
	24	197,21	584,29
Aceleração média geral (mm/s ²) ($P = 0,0024$)	0	145,75	584,55
	6	283,02	987,34
	12	282,53	1026,29
	24	443,89	1305,53
Taxa total de área explorada (%) ($P = 0,1216$)	0	29,41	37,41
	6	39,22	53,09
	12	45,10	53,70
	24	57,16	61,19
Distância média total percorrida (mm) ($P = 0,0458$)	0	2683,94	3694,59
	6	3549,02	5439,05
	12	4155,74	6337,59
	24	6479,95	6728,04

Figura 11 – Representações gráficas da trajetória dos animais durante o período de rastreamento, geradas no programa ToxTrac. a. Trilhas de rastreamento obtidas após 7 segundos do início do videomonitoramento, confirmando a eficácia da programação e a capacidade de tracking (controle negativo, arena 1, sequência 1). b. Trilhas(sobrepostas) mostrando as trajetórias percorridas até o fim dos ensaios pelos indivíduos do grupo controle (arena 1, sequência 1-3). c. Trilhas (sobrepostas) referentes aos grupos expostos, obtidas do início ao fim das três exposições (arena 2).



Legenda: Cada cor é atribuída a um dos animais, conforme mostrado na figura 10b; o retângulo em cor preta (em c.) representa a área de *tracking* delimitada.

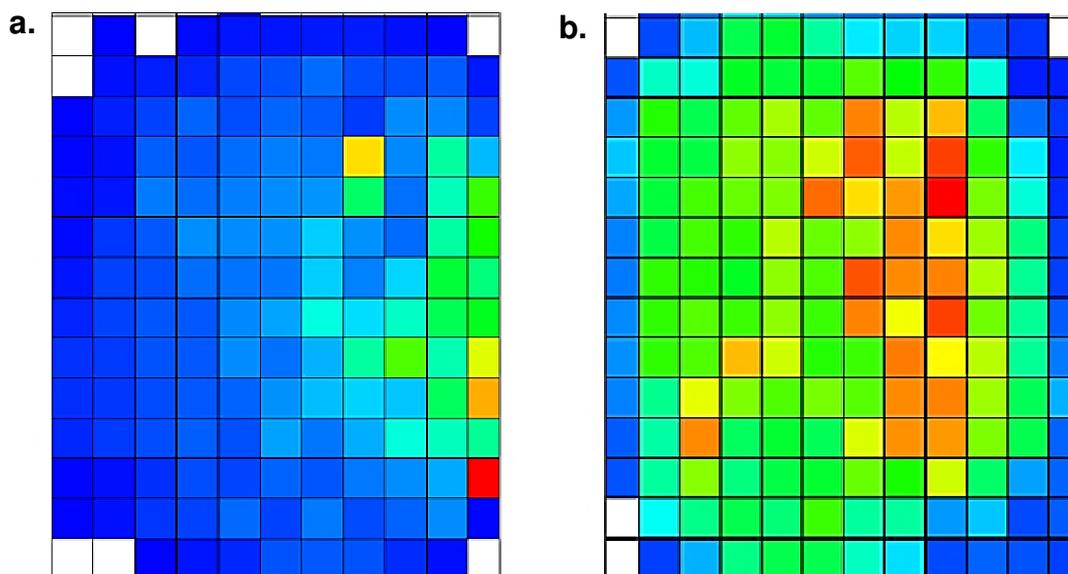
Não foram observadas mortes de peixes durante o período de exposição e nem posteriormente aos ensaios (0% de letalidade), caracterizando uma baixa toxicidade aguda das amostras testadas. O mesmo foi verificado no grupo controle.

No entanto, os valores finais obtidos na análise dos vídeos capturados apontam maior aceleração média ($P=0,0024$), maior velocidade média ($P=0,0003$) e maior distância média percorrida ($P=0,0458$) relativa aos indivíduos expostos à mistura complexa de substâncias presente nas amostras provenientes da fonte de água que apresentou o menor índice de qualidade durante os cálculos do IQA; indicando que a exposição teve efeito direto sobre a atividade locomotora dos animais. Apenas a área total explorada dentro dos tanques não divergiu significativamente ($P = 0,1216$) entre os grupos de animais expostos e o controle. Os desfechos (*endpoints*) comportamentais avaliados comprovaram-se mais sensíveis nas condições testadas que a mortalidade.

Através da análise dos quadrantes mostrados na figura 12 é possível perceber graficamente a extensão da diferença comportamental de mobilidade entre os peixes expostos (arena 2, sequências de vídeo 1-3) e os do grupo-controle (arena 1,

sequência de vídeo 1-3) dentro dos tanques contendo as amostras com substâncias potencialmente tóxicas e a solução controle.

Figura 12 – Gráficos de exploração gerados através das médias de tempo de ocupação e circulação dos 5 animais presentes em cada tanque, representando a média dos três ensaios. a. Área explorada pelos indivíduos do grupo controle. b. Área explorada pelos indivíduos expostos à água do Catolé.



Legenda: Cores mais quentes indicam maior tempo de permanência no quadrante e cores mais frias, menor tempo. Quadrantes sem cor não foram explorados pelos peixes durante o período analisado.

Fonte. *Print screens* do programa ToxTrac, executado no sistema operacional Windows 10.

6. DISCUSSÃO

Os dados obtidos através da análise físico-química preliminar e a quantificação de metais demonstram que as amostras testadas não apresentavam grandes desvios dos padrões de qualidade exigidos e nem metais tóxicos em altas concentrações, portanto uma baixa toxicidade teórica era esperada para o momento de avaliação dos seus efeitos *in vivo*. Considerando isto, a avaliação de efeitos neuromotores nos espécimes expostos mostrou-se como sendo a modalidade de ensaio de toxicidade mais apropriada para demonstrar os efeitos das substâncias presentes na mistura, devido sua sensibilidade e a possibilidade de verificação rápida de tais efeitos, o que não seria possível na eventual análise de danos teciduais, por exemplo, em face de agentes toxicantes em baixas concentrações; enquanto que a determinação do IQA possibilitou a seleção das amostras com menores índices de qualidade para os posteriores bioensaios, sendo estas tratadas como prioridade na testagem toxicológica devido ao seu maior potencial de causar danos à saúde de organismos vivos.

Embora seja necessária uma avaliação constante e sistemática das águas provenientes de corpos superficiais – por conta da sua vulnerabilidade característica –, poucos estudos locais sobre a qualidade da água foram identificados na literatura.

Carvalho (1998), em avaliação da qualidade da água do Rio Pratagy através do IQA, realizou os cálculos atribuindo o maior peso (valor máximo = 1) para os parâmetros coliformes fecais (NMP/100 ml) e o oxigênio dissolvido (OD). Em seu estudo, ele determinou o IQA naquele ano com sendo 44 e classificou a qualidade das águas daquele rio como “Aceitável”. O IQA aqui calculado encontra-se relativamente próximo deste valor, enquadrado na mesma faixa qualitativa (Aceitável/Razoável) de classificação de qualidade, de acordo com o padrão usado pela CETESB; enquanto que ambas os IQAs são classificados como “Ruins” se levada em consideração as exigências de qualidade de água adotadas em Alagoas.

Já Ferreira e Nascimento (2018), analisando a qualidade da água do Rio Pratagy no ponto de coleta da CASAL, encontrou o resultado de IQA de 37,99 para este local naquele momento, classificando a sua qualidade como “Regular”, de acordo com a classificação da CETESB, o que condiz com o estudo apresentado anteriormente etambém com os dados levantados nos ensaios descritos nesta presente dissertação. Esta dupla identificou uma turbidez quase 5 vezes maior que a observada por nós, o que impactou consideravelmente na redução do valor calculado de IQA pelos mesmos. Uma possível justificativa para esta grande variação na turbidez observada entre os dois estudos, no intervalo de apenas um ano, pode estar ligada à sazonalidade de chuvas no local e o período de coleta das amostras ao longo do ano, pois os valores de IQA apresentados demonstram as condições da água no momento exato da coleta.

A pouca variação nos valores de IQA observados em estudos que analisaram as águas do Rio Pratagy nos últimos 20 anos indicam que, apesar de não ter sido verificada grande melhora na qualidade da água deste corpo superficial, as ações de conservação têm sido eficazes em conter o avanço das ações antrópicas prejudiciais sobre esta APA e seus recursos hídricos.

Pesquisas anteriores sobre a qualidade das águas da Barragem do Catolé ou do Riacho do Catolé/Aviação que envolvam os parâmetros adotados neste estudo não foram localizadas na literatura, limitando a análise retrospectiva do seu padrão de qualidade ao estado atual, identificado nas nossas análises.

Um estudo com *design* semelhante desenvolvido no estado de Alagoas, envolvendo águas represadas, foi realizado na barragem Bálamo, situada no município de Palmeira dos Índios e usada em sistemas de irrigação do mesmo município. Neste trabalho foi apontado que o IQA das águas da barragem Bálamo, distante cerca de 135 Km de Maceió, variou entre 48 e 58, conferindo a classificação de “Razoável” (padrão CETESB) para a qualidade média destas águas (SANTOS, M. M.; MEDEIROS, P. R. P.; ABREU, F. C. A., 2017). Resultado semelhante foi observado nas nossas análises referentes à barragem do Catolé.

Tratando-se da avaliação de toxicidade de amostras de água *in vivo*, estudos recentes sugerem que o uso de amostras *in natura*, como as adotadas nesta pesquisa, é mais apropriado para a predição de biodisponibilidade e que os efeitos biológicos dos contaminantes presentes seriam mais próximos dos efeitos observados no ambiente de origem das amostras (BOEHLER et al., 2017). Neste contexto, a polaridade química, solubilidade dos componentes presentes e do meio em que estes estão dissolvidos são importantes fatores a considerar na realização dos bioensaios. Porém, apesar de amostras contendo componentes de menor solubilidade, como metais precipitáveis, apresentarem maior dificuldade nos ensaios envolvendo exposições aquosas, Bergmann, Tanguay e Anderson (2017) ressaltaram que é possível melhorar a análise através do controle da concentração desses compostos no meio aquoso e que amostras com essas características não inviabilizam a adoção de bioensaios com zebrafish.

A presença dos metais identificados nas amostras pode ser justificada através de diversos fatores. Uma grande causa de contaminação por este tipo de agente químico é o chorume produzido a partir do lixo doméstico e levado para os corpos d'água superficiais pela chuva. Ele é bem conhecido como poluente e é produzido pela passagem de um líquido através de materiais, gerando uma solução complexa que pode se infiltrar no solo e contaminar água, levando consigo diversas substâncias possivelmente tóxicas dissolvidas (DEGUCHI et al., 2007; RODRÍGUEZ-LIÉBANA; MINGORANCE; PEÑA, 2014).

Na análise de chorume em contato com águas de um rio, Zhou e colaboradores encontraram alta toxicidade em ensaios usando o modelo zebrafish, e, também, relação direta entre as concentrações de amostras em diversas diluições e os efeitos

observados *in vivo*, sugerindo um efeito tóxico dose-dependente para este tipo de amostra CHUVA (ZHOU et al., 2017). Ao analisar a relação entre sazonalidade e toxicidade de efluentes de indústrias farmacêuticas, através amostras coletadas em diferentes estações do ano, Bielenet al (2017) também identificaram redução de efeitos tóxicos relacionada com a diluição das amostras, o que demonstra a relevância da sazonalidade e pluviometria local sobre a concentração e consequente toxicidade de contaminantes em amostras ambientais.

Com relação a alta salinidade de amostras referentes ao Pratygy, a análise de toxicidade usando o modelo zebrafish não é a mais indicada, pois limitações de bioensaios com este animal já foram identificadas nos casos de análise de água com alta concentração de sais, como água marinha (FU et al., 2014; ZITOVA et al., 2009). Fu et al (2014) ressaltaram que a alta salinidade deste tipo de amostra prejudicou a viabilidade de embriões e Zitova et al (2009) mencionaram uma queda na taxa respiratória dos peixes quando em testes de amostras de água do mar. Esse último grupo citado sugeriu que o prejuízo verificado poderia se dar pelo fato de que o zebrafish é um peixe de água doce, cuja fisiologia não é adaptada à permanência em meios mais salinos. He et al (2017) sugeriram que, em alguns casos, a alta salinidade da amostra pode ser mais tóxica para este modelo que os demais componentes presentes na mistura.

Sensibilidade é um aspecto crucial em ensaios de toxicidade *in vivo*. Na avaliação de toxicidade de efluentes, Valitalo et al (2017) apontaram o modelo zebrafish como tendo alta sensibilidade em todas as amostras testadas, mesmo nas mais baixas concentrações, como constatado aqui através da caracterização dos contaminantes e posteriores ensaios de exposição. Na análise de toxicidade de água de rio usando a bactéria luminescente (luminous) *Vibrioqinghaiensis* e embriões de zebrafish como modelos, os embriões se mostraram mais sensíveis do que as bactérias (ZHANG et al., 2015). Em bioensaios envolvendo os três principais estágios de desenvolvimento do zebrafish – embrião, larva e adulto –, os peixes adultos se mostraram os menos sensíveis quando expostos aos mesmos tipos de amostras que embriões e larvas (ZHOU et al., 2017), possivelmente devido ao fato de que animais em estágio de desenvolvimento mais avançado apresentam mecanismos fisiológicos de defesa mais diversificados e eficientes contra os efeitos tóxicos de xenobióticos.

Apesar de verificar-se na literatura que a mortalidade continua sendo o *endpoint* mais comumente avaliado em bioensaios com zebrafish, Bergmann et al (2017), ao analisar extratos de água de rio, apontaram a mortalidade como sendo o *endpoint* menos sensível entre os observados nos seus ensaios; enquanto que Carlsson et al (2014) encontraram pigmentação e taxa cardíaca como *endpoints* mais sensíveis nos seus testes de toxicidade de água, indicando que os *endpoints* mais sensíveis podem variar conforme o tipo de amostra analisada e sua composição. Em bioensaios com amostras de diferentes efluentes, as alterações fisiológicas observadas em decorrência da exposição não tiveram relação direta com os locais específicos de coleta das amostras, demonstrando uma resposta mais geral ao estresse induzido pela exposição (VÄLITALO et al., 2017).

Embora o comportamento do animal seja afetado pela exposição a constituintes tóxicos presentes nas amostras – muitos destes conhecidos como neurotóxicos – e que testes comportamentais já tenham sido adaptados para execução usando o zebrafish, com metodologias validadas (CHAMPAGNE et al., 2010), poucos trabalhos recentes (últimos 10 anos) disponíveis na literatura, com metodologia voltada para análise toxicológica e avaliação da qualidade de água de origem ambiental usando esse peixe, abordam *endpoints* relacionados com aspectos comportamentais. As publicações neste segmento tornam-se ainda mais escassas quando a busca é restrita à análise de parâmetros comportamentais de indivíduos expostos na avaliação da qualidade de águas superficiais brasileiras. Um dos poucos estudos encontrados que batem com tais características foi conduzido por um grupo de pesquisadores da Universidade Federal do Rio Grande (Rio Grande do Sul - Brasil), onde foi avaliada a memória de longo prazo dos peixes e foi demonstrado que a exposição a amostras ambientais de água induziu efeitos amnésicos em indivíduos da espécie *Daniorerio*, o que indica que há um grande leque de possibilidades no campo comportamental a ser melhor explorado neste tipo de bioensaio.

Uma possibilidade interessante para aprofundamento futuro na compreensão dos mecanismos envolvidos nos efeitos tóxicos decorrentes da exposição aos agentes contaminantes identificados nas águas do Catolé e Pratygyé é estimar a ativação do citocromo P450 1A (CYP1A) nos organismos expostos, através da atividade de Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) (HE et al., 2017). Este citocromo

é conhecido por atuar na metabolização de xenobióticos (KIM et al., 2013). Outra técnica útil que pode ser empregada é o PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR), que é usado para entender a resposta desencadeada pela exposição aos agentes químicos presentes nas amostras, através da análise da expressão de genes envolvidos em diversos mecanismos relacionados (PRADHAN et al., 2017). A avaliação da expressão gênica nos peixes mostra-se vantajosa por sua relação com alterações na função celular e, conseqüentemente, na fisiologia do organismo; também por sua relação direta com diversos problemas graves de saúde decorrentes da exposição aos metais pesados e pesticidas, como o câncer (VALVERDE; ROJAS, 2009).

7 CONCLUSÕES

Embora as águas brutas dos corpos superficiais em estudo não atendam a todos os requisitos de qualidade estabelecidos pela legislação para a finalidade que são destinadas e seus IQAs tenham ficado nas faixas entre “Ruim” e “Regular”, o processo de tratamento mostrou-se eficaz na adequação dessas águas aos padrões exigidos para potabilidade pela legislação brasileira. No entanto, a presença de metais tóxicos, incluindo alguns dos classificados como “pesados” – identificados em baixas concentrações em ambos os tipos de amostras, brutas e tratadas – revela que o processo de tratamento adotado pouco influencia na quantidade desses micropoluentes que chegam à etapa em que a água é considerada como pronta para utilização humana, o que demonstra sua ineficiência nesse aspecto e reflete em possível risco para a população abastecida.

Os resultados provenientes dos ensaios de exposição confirmam a importância dos bioensaios na avaliação toxicológica de água e a adequação, para esta finalidade, do uso do modelo zebrafish, pois alterações no comportamento natural dos peixes expostos puderam ser verificadas mesmo em concentrações baixas dos agentes tóxicos ($P < 0.05$), em comparação ao grupo controle. Os efeitos observados *in vivo* servem de alerta para a necessidade de reforço nas medidas de proteção ambiental das áreas em estudo e de continuidade na avaliação da qualidade de suas águas, visando evitar a ocorrência de prejuízos ao ecossistema local em longo prazo.

Mais ensaios de ordem físico-química, para identificação e quantificação de outros componentes tóxicos nas amostras, e a aplicação de outras técnicas de avaliação de toxicidade pós-exposição, como testes de embriotoxicidade e genotoxicidade, fazem-se necessários para uma melhor compreensão do impacto da exposição em demais aspectos da fisiologia dos organismos expostos e dos mecanismos de toxicidade envolvidos nas alterações neuromotoras aqui observadas.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS M, et al. *Vibrio fischeri* bioluminescence inhibition assay for ecotoxicity assessment: A review. **Sci Total Environ.** 1;626:1295–309.2018.

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 15088 de 12/2016: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com peixes.** ABNT, 2016.

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 13797 de 1997: Determinação de cloretos em água – Métodos titulométricos do nitrato mercúrico e do nitrato de prata.** ABNT, 1997.

ALAGOAS (Estado). Decreto nº 37.589, de 05 de junho de 1998. Cria Área de Proteção Ambiental do Pratagy e dá providências correlatas. **Diário Oficial de Alagoas.** 06 de junho de 1998.

_____. Lei nº 5.347, de 27 de maio de 1992. Dispõe sobre a Área de Proteção Ambiental do Catolé e de Fernão Velho e dá outras providências correlatas. **Diário Oficial de Alagoas**. 28 de março de 1992.

AMADO, L. L. et al. Integrated biological responses of zebrafish (*Danio rerio*) to analyze water quality in regions under anthropogenic influence. **Chemosphere**, v. 82, n. 11, p. 1563–1570, 1 Mar. 2011.

ANA – Agência Nacional das Águas: Qualidade das Águas. Brasília: Governo Federal, 2018. Disponível em: <<http://www3.ana.gov.br/portal/ANA/panorama-das-aguas/qualidade-da-agua>> Acesso em: 10 de janeiro de 2019.

ANDRADE, E. L.; OLIVEIRA, A. N. S.; SANTOS, A. L. S. Proposta de Recomposição das matas ciliares dos principais corpos hídricos da APA do Catolé e Fernão velho. In: 8 Simpósio Brasileiro de Geografia Física Aplicada, 2009, Viçosa. **Resumo expandido**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa; 2009. Disponível em: <http://www.geomorfologia.ufv.br/simposio/simposio/trabalhos/resumos_expandidos/eixo12/010.pdf> Acesso em: 23 de janeiro de 2019.

ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Control: CERCL priority list of hazardous substances. Atlanta: United States Department of Health and Human Services, 2015. Disponível em: <<http://www.atsdr.cdc.gov/spl/>>. Acesso em 25 de novembro de 2018.

BATINGA, J. V. et al., A. L. impactos ambientais na APA do Catolé-Alagoas e no seu entorno. In: Congresso Norte-Nordeste de Pesquisa e Inovação, 2010, Maceió. **Resumo expandido**. Maceió: Instituto Federal de Alagoas; 2010. Disponível em: <<http://congressos.ifal.edu.br/index.php/connepi/CONNEPI2010/paper/viewFile/501/315>> Acesso em: 23 de janeiro de 2019.

BECK, N. G.; FRANKS, R. P.; BRULAND, K. W. Analysis for Cd, Cu, Ni, Zn, and Mn in estuarine water by inductively coupled plasma mass spectrometry coupled with an automated flow injection system. **Analytica Chimica Acta**. [s.l: s.n.].

BENFENATI, E. et al. Simultaneous analysis of 50 Pesticides in Water Samples by Solid Phase Extraction and Gas Chromatography. **Chemosphere**, v. 21, n.12, p. 1411-1421. 1990.

BERGMANN, A. J.; TANGUAY, R. L.; ANDERSON, K. A. Using passive sampling and zebrafish to identify developmental toxicants in complex mixtures. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 36, n. 9, p. 2290–2298, 1 Sep. 2017.

BIELLEN, A. et al. Negative environmental impacts of antibiotic-contaminated effluents from pharmaceutical industries. **Water Research**, v. 126, p. 79–87, 1 Dec. 2017.

BOEHLER, S. et al. Assessment of urban stream sediment pollutants entering estuaries using chemical analysis and multiple bioassays to characterise biological activities. **Science of The Total Environment**, v. 593–594, p. 498–507, 1 Sep. 2017.

BOXALL, A. B. A. et al. Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: What Are the Big Questions? **Environmental Health Perspectives**, v. 120, n. 9, p. 1221–1229, 30 May 2012.

CARLSSON, G. et al. Toxicity Screening of Produced Water Extracts in a Zebrafish Embryo Assay. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 77, n. 9–11, p. 600–615, 3 Jun. 2014.

CHAULET, F. C. Efeitos do fipronil e/ou glifosato sobre o comportamento do zebrafish (*Danio rerio*). 2018. Dissertação de Mestrado – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2018. Disponível em: <<http://tede.upf.br/jspui/bitstream/tede/1643/2/2018FabeledeCostaChaulet.pdf>> Acesso em: 5 de janeiro de 2019.

CARVALHO, G. S. O índice de qualidade da água e sua aplicação no gerenciamento dos recursos hídricos em Maceió. In: Simpósio Internacional Sobre Gestão de Recursos Hídricos, 1998, Gramado. **Resumo expandido**. Gramado: SISGRH, 1998. Disponível em: <<http://www.geocities.ws/singreh/Web/S44/18.pdf>> Acesso em: 30 de janeiro de 2019.

CETESB - COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. Qualidade das águas superficiais do Estado de São Paulo: Apêndice D - Índices de Qualidade das Águas. São Paulo: Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, 2014. **Relatório Técnico**. Disponível em: <<https://cetesb.sp.gov.br/aguas-interiores/wp-content/uploads/sites/12/2017/11/Ap%C3%AAndice-D-%C3%8Dndices-de-Qualidade-das-%C3%81guas.pdf>> Acesso em: 9 de janeiro de 2019.

_____. **Guia nacional de coleta e preservação de amostras: água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidos**. Organizadores: Carlos Jesus Brandão ... [et al.] São Paulo: CETESB, 2011.

CHAMPAGNE, D. L. et al. Translating rodent behavioral repertoire to zebrafish (*Danio rerio*): Relevance for stress research. **Behavioural Brain Research**, v. 214, n. 2, p. 332–342, 25 Dec. 2010.

CHEN, Z.; ZHU, L.; WILKINSON, K. J. Validation of the Biotic Ligand Model in Metal Mixtures: Bioaccumulation of Lead and Copper. **Environmental Science & Technology**, v. 44, n. 9, p. 3580–3586, May 2010.

DEGUCHI, Y. et al. Evaluation of mutagenic activities of leachates in landfill sites by micronucleus test and comet assay using goldfish. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 627, n. 2, p. 178–185, Mar. 2007.

ELIS, V. R.; BARROSO, C. M. R.; KIANG, C. H. Aplicacao De Ensaio De Resistividade Na Caracterizacao Do Sistema Aquifero Barreiras / Marituba Em Maceio–Al. **Brazilian Journal of Geophysics**, v. 22, n. 2, p. 101–113, 2004.

FERREIRA, A. S.; NASCIMENTO, M. S. A. **Determinação do Índice de Qualidade da Água no ponto de captação do sistema de abastecimento situado no Rio**

Pratagy, Maceió - AL. 2018. Trabalho de Conclusão de Curso – Centro Universitário CESMAC, Maceió, 2018.

FU, J. et al. Heavy metals in seawater, sediments, and biota from the coastal area of Yancheng City, China. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 33, n. 8, p. 1697–1704, 1 Aug. 2014.

FUNASA - FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Manual prático de análise de água**. 4ª ed. rev. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2013.

GUO, J.; KANG, Y.; FENG, Y. Bioassessment of heavy metal toxicity and enhancement of heavy metal removal by sulfate-reducing bacteria in the presence of zero valent iron. **Journal of Environmental Management**, v. 203, n. Pt 1, p. 278–285, 1 Dec. 2017.

HE, Y. et al. Chemical and toxicological characterizations of hydraulic fracturing flowback and produced water. **Water Research**, v. 114, p. 78–87, 1 May 2017.

HU, Y. et al. Contamination of organochlorine pesticides in water and sediments from a waterbird-inhabited lake, East Central China. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 15, p. 9376–9384, 17 Aug. 2014.

IMA-AL - INSTITUTO DO MEIO AMBIENTE DE ALAGOAS. Unidades de conservação. Maceió: Instituto do Meio Ambiente de Alagoas, 2015. Disponível em: <<http://www.ima.al.gov.br/unidades-de-conservacao/>> Acesso em: 11 de novembro de 2018.

KAWAKUBO, F. et al. (2005). Caracterização empírica da fragilidade ambiental utilizando geoprocessamento. In: XII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto, 2015, Goiânia. **Anal decongresso**. Goiânia: INPE, 2015 p. 2203-2210. Disponível em: < <http://mar.te.inpe.br/col/ltid.inpe.br/sbsr/2004/11.19.16.10/doc/2203.pdf>> Acesso em: 13 de fevereiro de 2018.

KERSKI, J. What's Wrong With This Picture? The Declining Water Table. **The Geography Teacher**, v. 11, n. 2, p. 82–85, 3 Apr. 2014.

_____. Water Quality. **The Geography Teacher**, v. 14, n. 1, p. 36–41, 2 Jan. 2017.

KIM, R.-O. et al. Evaluation of biomarker potential of cytochrome P450 1A (CYP1A) gene in the marine medaka, *Oryzias melastigma* exposed to water-accommodated fractions (WAFs) of Iranian crude oil. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 157, n. 2, p. 172–182, Mar. 2013.

LEHMANN, E. et al. Assessment of water resource contamination by pesticides in vegetable-producing areas in Burkina Faso. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 4, p. 3681–3694, 21 Feb. 2018.

LI, C. et al. An integrated approach with the zebrafish model for biomonitoring of municipal wastewater effluent and receiving waters. **Water Research**, v. 131, p. 33–44, 15 Mar. 2018.

MACEIO.AL.GOV.BR. Maceió: Secretaria Municipal de Desenvolvimento Territorial, 2017. Disponível em: <<http://www.maceio.al.gov.br/2017/03/usina-da-prefeitura-favorece-a-sustentabilidade-em-obras/>>. Acesso em: 9 jul. 2018.

MARTINEZ, C. B.; VIANA, E. M. F.; FARIA, M.T.C. Um estudo sobre a movimentação de peixes no tubo de sucção de uma turbina hidráulica. In: THE 9th LATIN-AMERICAN CONGRESS ON ELECTRICITY GENERATION AND TRANSMISSION, Mar del Plata Argentina. **Resumo expandido.CLAGTEE: 2011** Disponível em: <https://www.cemig.com.br/pt-br/A_Cemig_e_o_Futuro/sustentabilidade/nossos_programas/ambientais/peixe_vivo/Documents/PeD/PeD-ulica.pdf> Acesso em: 10 de fevereiro de 2019.

MCGRATH, P.; LI, C.-Q. Zebrafish: a predictive model for assessing drug-induced toxicity. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 9–10, p. 394–401, 1 May 2008.

MICHIELS, E. et al. Evaluating Complex Mixtures in the Zebrafish Embryo by Reconstituting Field Water Samples: A Metal Pollution Case Study. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 3, p. 539, 2 Mar. 2017.

NAELE, P. A. et al. Integrating chemical analysis and bioanalysis to evaluate the contribution of wastewater effluent on the micropollutant burden in small streams. **Science of the Total Environment**. v. 576, p. 785–795, 2017.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Test no. 236: fish embryo acute toxicity (FET) test**. [s.l.] OECD, 2013.

PARRIS, K. Impact of agriculture on water pollution in OECD countries: Recent trends and future prospects. **International Journal of Water Resources Development**, v. 27, n. 1, p. 33–52, 6 Mar. 2011.

PERRON, M. M. et al. Bioavailability assessment of a contaminated field sediment from Patrick Bayou, Texas, USA: Toxicity identification evaluation and equilibrium partitioning. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 29, n. 3, p. 742–750, 1 Mar. 2010.

PIZZUTTI, I. R. et al. Pesticide Residues Method Validation by UPLC-MS/MS for Accreditation Purposes. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 7, p. 1165–1176, 2016.

PRADHAN, A. et al. Transcriptional responses of zebrafish to complex metal mixtures in laboratory studies overestimates the responses observed with environmental water. **Science of The Total Environment**, v. 584–585, p. 1138–1146, 15 Apr. 2017.

QIU, A. et al. Evaluation of the Treatment Process of Landfill Leachate Using the Toxicity Assessment Method. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 13, n. 12, p. 1262, 21 Dec. 2016.

RESENDE, R. R.; SOCCOL, C. R. **Biotecnologia aplicada à saúde: fundamentos e aplicações**. São Paulo: Blucher, 2015. Vol. 1.

RIEHL, R. et al. Behavioral and physiological effects of acute ketamine exposure in adult zebrafish. **Neurotoxicology and Teratology**. N. 33, p. 658–667. 2011.

Disponível

em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0892036211000717?via%3Dihub>> Acesso em: 19 de março de 2019.

RODRIGUEZ, A. et al. ToxId: an algorithm to track the identity of multiple animals. **Scientific Reports**. 7(1):14774. 2017.

_____. ToxTrac: a fast and robust software for tracking organisms. **Methods in Ecology and Evolution**. 9(3):460–464. 2018.

RODRÍGUEZ-LIÉBANA, J. A.; MINGORANCE, M. D.; PEÑA, A. Pesticide mobility and leachate toxicity in two abandoned mine soils. Effect of organic amendments. **Science of The Total Environment**, v. 497–498, p. 561–569, 1 Nov. 2014.

SABESP – COMPANHIA DE SANEAMENTO BÁSICO DO ESTADO DE SÃO PAULO. Norma Técnica Interna nº 03. São paulo : Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo, 1997. **Nota técnica**. Disponível em: <<http://www2.sabesp.com.br/normas/nts/nts003.pdf>> Acesso em: 29 de janeiro de 2018.

_____. Norma Técnica Interna nº 04. São paulo: Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo, 1997. **Nota técnica**. Disponível em: <<http://www2.sabesp.com.br/normas/nts/nts004.pdf>> Acesso em: 28 de janeiro de 2018.

_____. Norma Técnica Interna nº 10. São paulo: Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo, 2001. **Nota técnica**. Disponível em: <<http://www2.sabesp.com.br/normas/nts/nts004.pdf>> Acesso em: 18 de janeiro de 2018.

SANTOS, M. M.; MEDEIROS, P. R. P.; ABREU, F. C. Índices de qualidade da água da barragem Bálsamo de Palmeira dos Índios, Alagoas, Brasil. **AmbientAL**, Maceió, v. 1, n 1, p. 98-121, 2017.

SCHÄFER, R. B. et al. To the Editor. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 32, n. 4, p. 734–735, 2013.

SCHOLZ, S. et al. The zebrafish embryo model in environmental risk assessment—applications beyond acute toxicity testing. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 15, n. 5, p. 394–404, 25 Jul. 2008.

SCHREIBER, R. et al. How to deal with lipophilic and volatile organic substances in microtitier plates assays. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 27, n. 8, p. 1676, 2008.

SEMARH - SECRETARIA DO ESTADO DO MEIO AMBIENTE E RECURSOS HÍDRICOS DE ALAGOAS. Unidades de Conservação. Maceió: Secretaria do Estado do Meio Ambiente e Recursos Hídricos de Alagoas, 2019. Disponível em: <<http://www.semarh.al.gov.br/unidades-de-conservacao>> Acesso em: 13 de fevereiro de 2019.

SEPLANDE - SECRETARIA DE ESTADO DO PLANEJAMENTO E DO DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO DE ALAGOAS. Alagoas em mapas: Acervo de mapas do Estado de Alagoas. Edição 2. Maceió: Secretaria de Estado do Planejamento e do Desenvolvimento Econômico de Alagoas, 2014. **Relatório técnico**. Disponível em: <<http://dados.al.gov.br/dataset/a6504404-4b0a-47c4-a907-ae5645105ccd/resource/f999b3ba-b09c-43da-b58d-c80bd1dff3d3/download/alagoasemmapas2014edicao02.pdf>> Acesso em: 23 de janeiro de 2019.

SILVA, R. I. et al. Estimativa de oferta e demanda hídricas no Rio Pratagy, utilizando técnicas de regionalização. In: XVI Simpósio Brasileiro de Recursos Hídricos, 2005, João Pessoa. **Anal de com congresso**. Livros de Resumos, 2005.

SILVA, D. F. et al. **Análise de nitrato e amônio em solo e água**. Sete Lagoas: Embrapa, 2010, p. 55.

SIPES, N. S.; PADILLA, S.; KNUDSEN, T. B. Zebrafish-As an integrative model for twenty-first century toxicity testing. **Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews**, v. 93, n. 3, p. 256–267, 1 Sep. 2011.

SNIRH — Sistema Nacional de Informações sobre Recursos Hídricos: Mapa interativo digital de estações de monitoramento de qualidade de água em operação. Brasília: Governo Federal, 2018. Disponível em: <<http://portal1.snirh.gov.br/ana/apps/webappviewer/index.html?id=e745db7488f64e1a9a2e4e150e41b08e>> Acesso em: 05 de fevereiro de 2019.

TAVARES, K. A. S.; NETO, J. V. F. MAPEAMENTO DA SUSCEPTIBILIDADE EROSIVA NA BACIA HIDROGRÁFICA DO RIO PRATAGY, ALAGOAS. **Revista Contexto Geográfico**, v. 2, n. 4, p. 42–51, 24 Oct. 2018.

TUIKKA, A. I. et al. Toxicity assessment of sediments from three European river basins using a sediment contact test battery. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 1, p. 123–131, 1 Jan. 2011.

UNESCO - United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization. **Water security**. Paris: UNESCO, 2016. Disponível em: <http://www.worldwatercouncil.org/fileadmin/world_water_council/documents/official_documents/WWC_Brochure_2016_WEB.pdf> Acesso em: 09 de setembro de 2018.

VÄLITALO, P. et al. Effect-based assessment of toxicity removal during wastewater treatment. **Water Research**, v. 126, p. 153–163, 1 Dec. 2017.

VALVERDE, M.; ROJAS, E. Environmental and occupational biomonitoring using the Comet assay. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 681, n. 1, p. 93–109, 1 Jan. 2009.

VERDE, M. B. L. **Conflitos socioambientais: estudo de caso da APA do Catolé e Fernão Velho, Maceió-AL**. 2010. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2010.

ZHANG, L. et al. Toxicity of surface water from Huangpu River to luminous bacteria (*Vibrio qinghaiensis* SP. Q67) and zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 112, p. 137–143, 1 Feb. 2015.

ZHOU, Y. et al. Ecotoxicological bioassays of sediment leachates in a river bed flanked by decommissioned pesticide plants in Nantong City, East China. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 9, p. 8541–8550, 13 Mar. 2017.

ZITOVA, A. et al. Toxicological profiling of chemical and environmental samples using panels of test organisms and optical oxygen respirometry. **Environmental Toxicology**, v. 24, n. 2, p. 116–127, 1 Apr. 2009.

ANEXOS

1–Autorização do IMA para realização de pesquisa em áreas de proteção ambiental.

	INSTITUTO DO MEIO AMBIENTE Av. Major Cicero de Góes Monteiro, nº 2197, Mutange Maceió-AL CEP 57017-320 Fones: (082) 3315 – 1738/3315-1747/3315-1766/3315-1778 Fax: (082) 3315-1732. Site: www.ima.al.gov.br		
	ANUÊNCIA IMA/GEFUC:	Anuência para realização de pesquisa científica em Unidades de Conservação estaduais	N.º 05/2018
O Instituto do Meio Ambiente do Estado de Alagoas - IMA/AL, tendo em vista a solicitação do Sr. Orlando Ronaldo da Silva Santos, Mestrando			

2 –Autorização do CEUA/UFAL para realização dos ensaios *in vivo*.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



CERTIFICADO

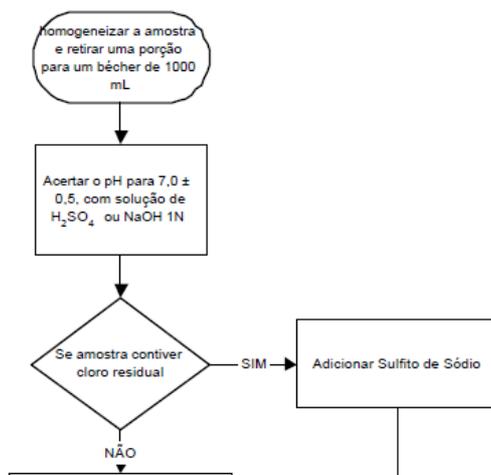
Certificamos que a proposta intitulada “*Bioensaios ecotoxicológicos em águas superficiais da região metropolitana de Maceió destinadas para consumo humano, usando Zebrafish (Danio rerio) como modelo animal*” registrada com o n° 72/2017, sob a responsabilidade da pesquisadora Profa. Dra. Maria Aline Barros Fidelis de Moura, que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n°

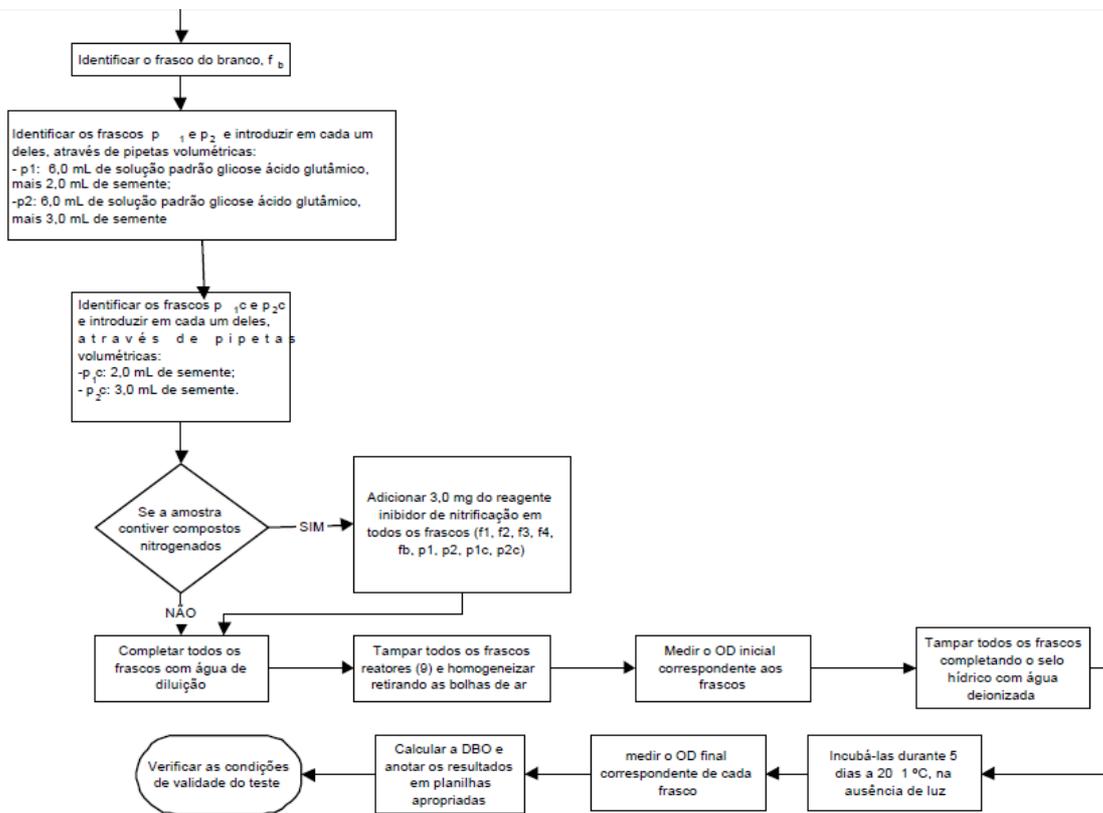
3 –Metodologia esquematizada de determinação da DBO.,

NTS 003 : 1997

Norma Técnica Interna SABESP

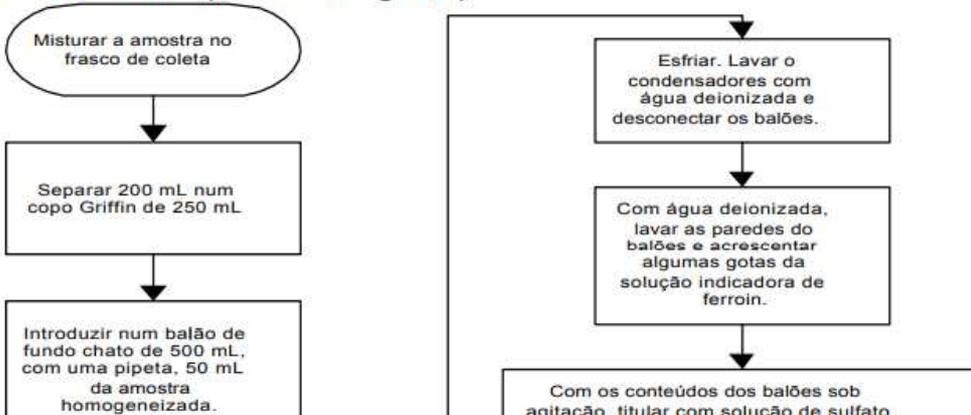
12.6 Representação esquemática do Procedimento

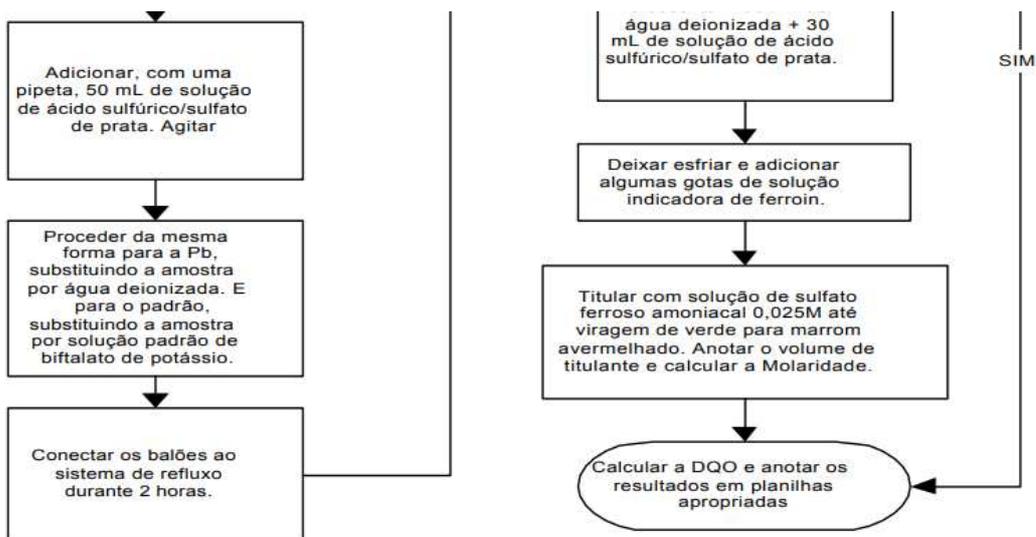




4 –Metodologia esquematizada de determinação da DQO da SABESP (1997).

13.2 Método B (DQO < 50 mg O₂/L)





5– Determinação de ferro total pelo método da 1,10-fenantrolina.

Norma Técnica SABESP NTS 010

DETERMINAÇÃO DE FERRO TOTAL: MÉTODO DA
1,10 FENANTROLINA

6– Determinação de cloretos segundo a NBR 13797 (1997) da ABNT.



**ABNT-Associação
Brasileira de
Normas Técnicas**

Seção:
Rio de Janeiro
Av. Treze de Maio, 13 - 28º andar
CEP 20002-902 - Caixa Postal 1888
Rio de Janeiro - RJ
Tel.: PABX (021) 218-2100
Fax: (021) 246-5048/509-0143
E-mail: abnt@abnt.org.br
NORMATECNA

Cópia não autorizada

ABR 1997 | NBR 13797

**Água - Determinação de cloretos -
Métodos titulométricos do nitrato
mercúrico e do nitrato de prata**

Método de ensaio

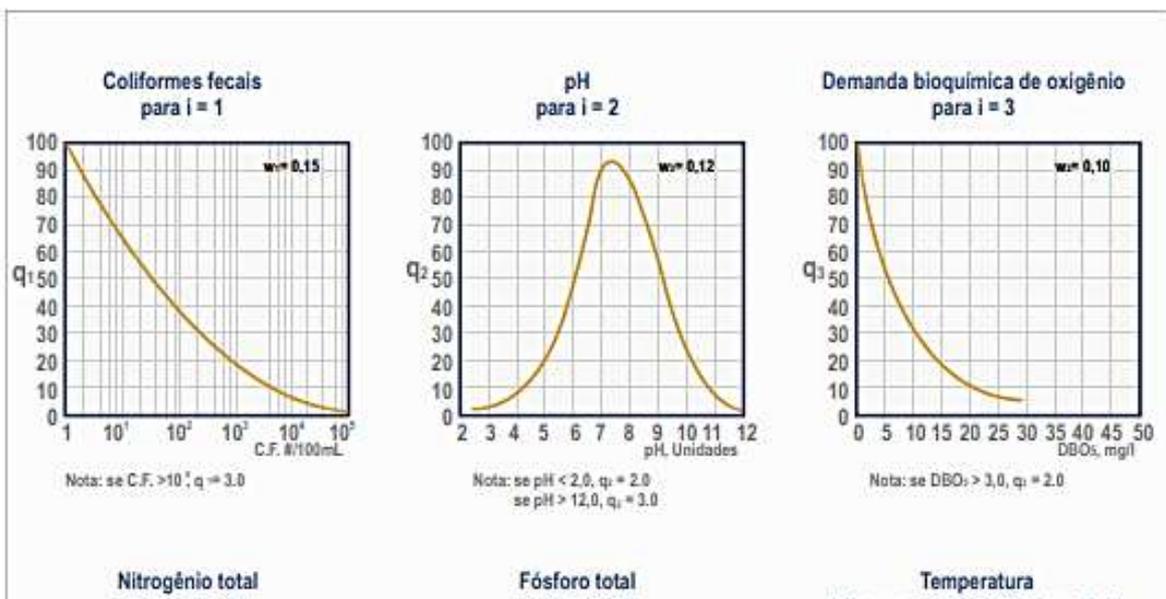
Origem: 2ª Projeto 01:602.03-010/199
CEÉT - Comissão de Estudo Especial Temporária de Meio Ambiente
CE-01:602.03 - Comissão de Estudo de Análises Inorgânicas
NBR 13797 - Água - Determination of chlorides mercury nitrate and silver nitrate

Tabela 1 – NMP. com limite de confiança de 95% para várias combinações de resultados positivos quando 5 tubos são usados para cada diluição (10 mL, 1,0 mL e 0,1 mL)

Combinação de positivos	NMP./100 mL	Limites	
		Inferior	Superior
0-0-0	< 2	-	-
0-0-1	2	1.0	10
0-1-0	2	1.0	10
0-2-0	4	1.0	13
1-0-0	2	1.0	11
1-0-1	4	1.0	15
1-1-0	4	1.0	15
1-1-1	6	2.0	18
1-2-0	6	2.0	18
2-0-0	4	1.0	17
2-0-1	7	2.0	20
2-1-0	7	2.0	21
2-1-1	9	3.0	24
2-2-0	9	3.0	25
2-3-0	12	5.0	29
3-0-0	8	3.0	24
3-0-1	11	4.0	29
3-1-0	11	4.0	29
3-1-1	14	6.0	35
3-2-0	14	6.0	35
3-2-1	17	7.0	40
4-0-0	13	5.0	38
4-0-1	17	7.0	45
4-1-0	17	7.0	46
4-1-1	21	9.0	55
4-1-2	22	12	63
4-2-0	26	9.0	56
4-2-1	26	12	65
4-3-0	27	12	67
4-3-1	33	15	77
4-4-0	34	16	80
5-0-0	23	9	86
5-0-1	30	10	110
5-0-2	40	20	140
5-1-0	30	10	120
5-1-1	40	20	160
5-1-2	60	30	180
5-2-0	50	20	170
5-2-1	70	30	210
5-2-2	90	40	250
5-3-0	80	30	250
5-3-1	110	40	300
5-3-2	140	60	360
5-3-3	170	80	410
5-4-0	130	50	390
5-4-1	170	70	480
5-4-2	220	100	560
5-4-3	280	120	690
5-4-4	350	160	820

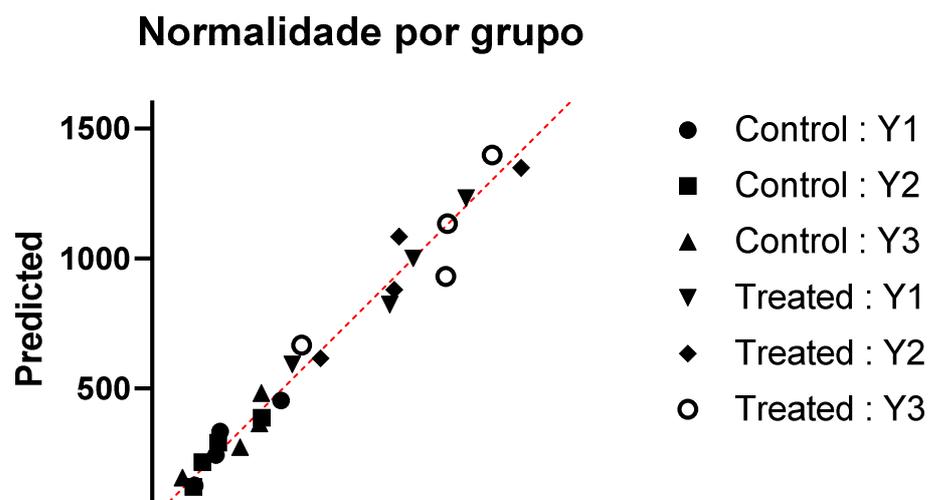
7 – Tabela referência da FUNASA/MS(2013) usada na determinação do NMP no ensaio microbiológico.

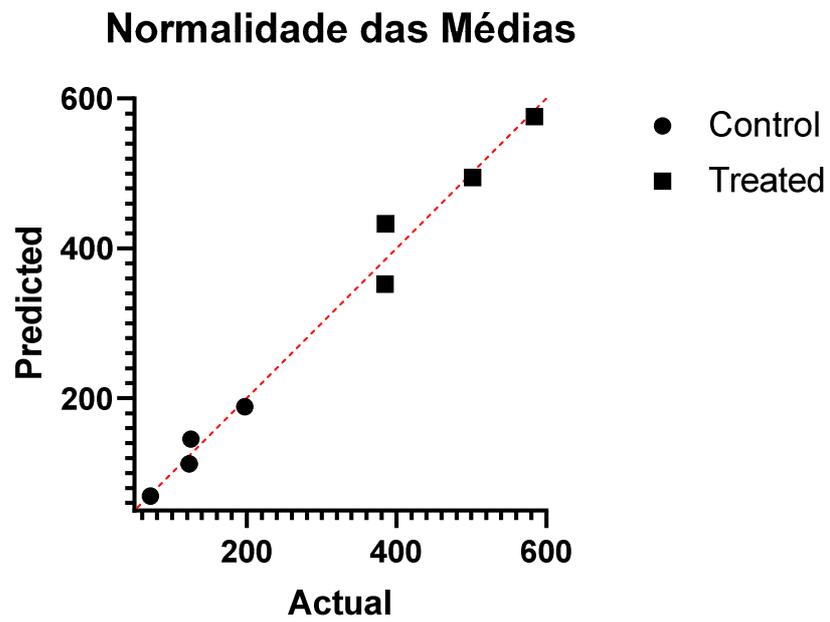
8- Gráficos de médias para atribuição dos valores de qualidade (q) usados no cálculo do IQA.



Fonte: ANA, 2018.

9 – Gráficos gerados pelo programa Prism[®] através do teste de Shapiro-Wilk (para $\alpha=0,05$), mostrando a distribuição dos dados.





10– Modelo do termo de consentimento para coleta em domicílio.

TERMO DE CONSENTIMENTO PARA COLETA EM DOMICÍLIO

Eu, _____, CPF nº _____, domiciliado(a) na residência nº _____ da _____, situada no município de Maceió – AL, autorizo a coleta de amostras de água de torneira de dentro da minha residência para fins de pesquisa acadêmica com a finalidade de avaliar a qualidade da água distribuída na capital alagoana, como parte do projeto *BIOENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS EM ÁGUAS SUPERFICIAIS DA REGIÃO METROPOLITANA DE MACEIÓ, USANDO ZEBRAFISH (Daniorerio) COMO MODELO ANIMAL*, vinculado ao PPGCF/ICF/UFAL.

Assinatura do morador

Maceió

___ / ___ / 2018

11 – Laudos completos das análises de pesticidas por GC-MS/MS emitidos pela FIOCRUZ/RJ.



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Escola Nacional de Saúde Pública
Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana
Laboratório de Toxicologia

Resultado de Análise

Tipo de Amostra: água • urina • filtro • solo
Identificação da Amostra: PA02 - ETA Cardoso-Catolé
Data da Coleta: 17/07/2019 Data do recebimento: 22/07/2019 Data da análise: 31/07/2019
Município: Maceió/AL
INº de Identificação do Laboratório de Toxicologia/CESTEH: 2019/1166
Estado: Alagoas

12 –Fotografias registrando o procedimento de coleta manual das amostras (Rio Pratagy, Maceió/AL); a execução dos ensaios microbiológicos, através da técnica de tubos múltiplos (Laboratório de Estudos Ambientais, IMA/AL); o curso realizado para aperfeiçoamento no manejo e avaliação de toxicidade usando zebrafish (Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada – LETA, Instituto Butantan, SP) ea manutenção dos espécimes usados nos bioensaios (LabTox, ICF/UFAL).



