



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

THAÍS LURI OHASHI

**ARSÊNIO EM AMOSTRAS DE SEDIMENTO DA MICROBACIA DO RIBEIRÃO
GUAMIUM, PIRACICABA, SP E SEU EFEITO EM ORGANISMOS
ZOOPLANCTÔNICOS**

São Carlos

2010

THAÍS LURI OHASHI

**ARSÊNIO EM AMOSTRAS DE SEDIMENTO DA MICROBACIA DO RIBEIRÃO
GUAMIUM, PIRACICABA, SP E SEU EFEITO EM ORGANISMOS
ZOOPLANCTÔNICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientadores: Prof. Dr. José Roberto Ferreira

Prof.^a. Dr.^a. Mirna Helena Regali Seleglim

São Carlos

2010

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

O36aa Ohashi, Thaís Luri.
Arsênio em amostras de sedimento da microbacia do
Ribeirão Guamium, Piracicaba, SP e seu efeito em
organismos zooplanctônicos / Thaís Luri Ohashi. -- São
Carlos : UFSCar, 2013.
122 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2010.

1. Biotecnologia. 2. Arsênio. 3. Sedimentos. 4.
Zooplâncton. 5. Toxicidade. I. Título.

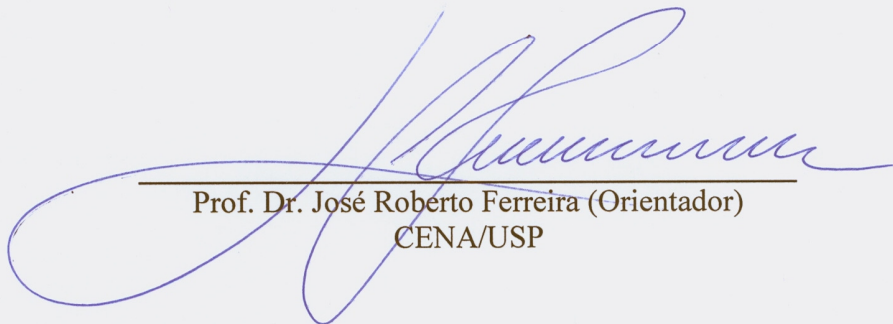
CDD: 660.6 (20^a)

Thaís Luri Ohashi

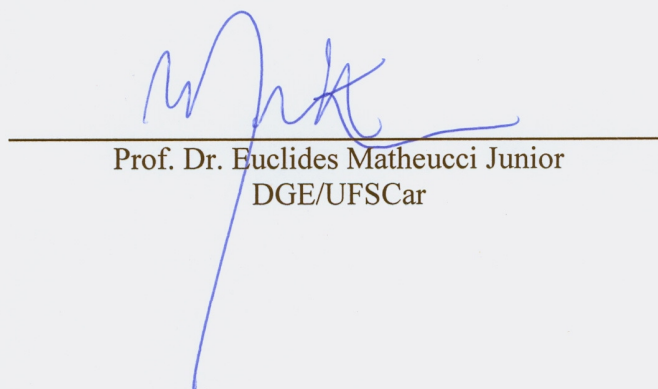
Dissertação de Mestrado submetida
à Coordenação do Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia,
da Universidade Federal de São
Carlos, como requisito parcial para
a obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia

Aprovado em: 09/09/2010

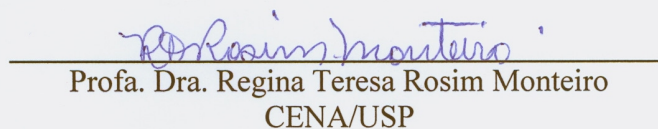
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. José Roberto Ferreira (Orientador)
CENA/USP



Prof. Dr. Euclides Matheucci Junior
DGE/UFSCar



Profa. Dra. Regina Teresa Rosim Monteiro
CENA/USP

À minha família, meu porto seguro, e a todas as pessoas queridas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho...

AGRADECIMENTOS

Especialmente aos Profs. Dr. José Roberto Ferreira e Dr^a. Mirna Helena Regali Seleglim, pela orientação, confiança, apoio e incentivo e, principalmente, por me auxiliar em mais uma etapa da minha formação acadêmica.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, pela concessão da bolsa de mestrado.

À Universidade Federal de São Carlos, pela oportunidade e infraestrutura oferecidas para a realização da pós-graduação.

À Prof^a. Dr^a. Odete Rocha, por permitir o uso das instalações, de aparelhos e de materiais de seus laboratórios, e contribuir com discussões valiosas sobre o trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva - DEBE da UFSCar pelo auxílio, em especial à Darci Javaroti e José Valdecir de Lucca, pela atenção, disposição, ensinamentos laboratoriais e momentos de descontração.

Aos companheiros de laboratório e amigos do DEBE: Ana Cláudia, Bruna, Denise, Emanuela, Erica, Fernanda, Henrique, Karina, Laine, Luciana, Mayara, Natália e Renata, pela ajuda imprescindível, apoio, carinho, incentivo, respeito e, principalmente, pela amizade.

À Dr^a. Patrícia Mayrink, pela bibliografia e materiais fornecidos, sugestões, apoio e incentivo.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura - CENA, em Piracicaba, pela infraestrutura oferecida para a realização de parte do trabalho.

A todos os professores, funcionários e amigos do CENA: Alfredo, Aparecida de Fátima, Douglas, Gabriel, Iracema, Milton, Sheila, Tatiana e Valdemir, pelo

zelo, hospitalidade, almoços, caronas, momentos de descontração, ajuda, presença, incentivo e carinho.

Ao Prof. Dr. Joaquim de Araújo Nóbrega e todo o grupo de Análise Instrumental Aplicada do Departamento de Química da UFSCar, em especial à Amália Gama e Marcelo Braga, pela bibliografia fornecida e ajuda na realização das análises no espectrômetro de absorção atômica em forno de grafite. Agradeço por todas as sugestões, palavras de apoio e incentivo.

A todos os meus familiares, especialmente aos meus pais, Lucilene e Fumio, por proporcionarem todas as condições para que eu chegasse até aqui; à minha irmã Vivian, minha fofa avó Adália e meu querido namorado Ubirajara, pela ajuda, compreensão, atenção, apoio, carinho, amizade e amor.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente colaboraram na realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

LISTA DE ABREVIATURAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AFS	Espectrometria de Fluorescência Atômica (do inglês <i>Atomic Fluorescence Spectrometry</i>)
APP	Áreas de Preservação Permanente
APTA	Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios
CAS	Chemical Abstracts Service
CE(I) ₅₀	Concentração Efetiva Inicial Mediana
CENO(I)	Concentração Inicial de Efeito Não Observado
CEO(I)	Concentração Inicial de Efeito Observado
CETESB	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
CL ₅₀	Concentração Letal
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CRM WQB-1	Material de Referência Certificado WQB-1 (do inglês <i>Certificated Reference Material WQB-1</i>)
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DIN	Deutsches Institut für Normung
DMA	Ácido Dimetilarsínico
dw	Peso Seco (do inglês <i>Dry Weight</i>)
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetraacético
Eh	Potencial de Óxido-redução
ETE	Estação de Tratamento de Esgoto
FATMA/GTZ	Fundação do Meio Ambiente/Agência Alemã de Cooperação Técnica
FEHIDRO - PCJ	Fundo Estadual de Recursos Hídricos - Bacias Hidrográficas dos Rios Piracicaba, Capivari e Jundiá
GFAAS	Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite (do inglês <i>Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry</i>)
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)

ICP-MS	Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado (do inglês <i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i>)
IGAM	Instituto Mineiro de Gestão das Águas
IRAR	Instituto Regulador de Águas e Resíduos
LOD	Limite de Detecção
LOQ	Limite de Quantificação
MMA	Ácido Monometilarsônico
MT	Metalotioneína
NWRI	National Water Research Institute
OD	Oxigênio Dissolvido
OMS	Organização Mundial da Saúde
p.a.	Para Análise
pH	Potencial Hidrogeniônico
ppm	Partes por Milhão
ppt	Partes por Trilhão
STD	Sólidos Totais Dissolvidos
UNT	Unidades Nefelométricas de Turbidez
USEPA	Agência Americana de Proteção Ambiental (do inglês <i>United States Environmental Protection Agency</i>)
VGQS	Valores-guia de Qualidade de Sedimentos
WHO	World Health Organization

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Vista geral do Ribeirão Guamium e sua inserção junto à bacia hidrográfica do Rio Piracicaba, SP (Adaptado do Projeto Aguamium, FEHIDRO - PCJ, Bacias Hidrográficas dos Rios Piracicaba, Capivari e Jundiá, Piracicaba, São Paulo).....	33
Figura 2. Bacia do Ribeirão Guamium contendo os respectivos pontos de coleta (Fonte: Google Earth).....	36
Figura 3. Ponto de coleta da Usina Capuava (P2), área rural na qual o corpo d'água se encontra extremamente dominado pelo plantio de cana-de-açúcar (Foto: Cleber Valim Alexandre)	38
Figura 4. Ponto de coleta da Estação de Tratamento de Esgoto São Jorge (P3), local caracterizado pela presença de cana-de-açúcar e pouca vegetação arbustiva (Foto: Cleber Valim Alexandre).....	39
Figura 5. Ponto de coleta do Disque Animais (P5), localizado à montante da represa do Ribeirão Guamium, área de pouca vegetação arbustiva e com presença de cana-de-açúcar (Foto: Cleber Valim Alexandre).....	39
Figura 6. Ponto de coleta do Condomínio (P6), ponto inicial das atividades urbanas mais intensas (Foto: Cleber Valim Alexandre)	40
Figura 7. Ponto de coleta do Matadouro (P8), situado próximo ao Rio Piracicaba, com notória presença de lixos nas margens, ocasionando assim águas sujas e fortes odores (Foto: Cleber Valim Alexandre)	40
Figura 8. Coletor de sedimento utilizado nas coletas (Foto: Cleber Valim Alexandre).....	41
Figura 9. Protozoário ciliado <i>Paramecium caudatum</i> utilizado nos testes de toxicidade (Fonte: http://www.moniqueslivefishfoods.co.uk/contents/media/) ..	44
Figura 10. Tubo de ensaio contendo ágar não nutriente inclinado e um grão de arroz com casca, utilizado como meio de cultura para protozoários bacterívoros (Foto: Henrique Cezar Alves)	44
Figura 11. Cladóceros <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> utilizado nos testes de toxicidade (Fonte: http://species.wikimedia.org/wiki/Ceriodaphnia_silvestrii)	46
Figura 12. Incubadora com temperatura e fotoperíodo controlados contendo os cultivos de <i>C. silvestrii</i> em béqueres de 2 L	46

Figura 13. Béquer contendo a amostra de sedimento em processo de sedimentação, na proporção de 4:1 (peso) de água de cultivo dos organismos e sedimentos, respectivamente.....	49
Figura 14. Microplaca de cultivo com 24 poços, destinada aos testes de toxicidade com o protozoário <i>P. caudatum</i>	51
Figura 15. Recipientes plásticos de poliestireno atóxicos contendo 10 mL de solução teste, utilizados nos testes de toxicidade aguda com o cladóceros <i>C. silvestrii</i>	52
Figura 16. Incubadora utilizada para o experimento de toxicidade aguda com o cladóceros <i>C. silvestrii</i>	53
Figura 17. Espectrômetro de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS) utilizado na determinação das concentrações de As total na água de cultivo, no sobrenadante do sedimento e nos organismos-teste.....	55
Figura 18. Estufa a 60 °C por 48 h para secagem das membranas contendo os organismos.....	55
Figura 19. Estufa a 90 °C por 48 h para digestão ácida dos organismos em frascos de policarbonato	56
Figura 20. Curvas de temperatura de pirólise e atomização para solução de 50 µg L ⁻¹ As, em meio de HNO ₃ 0,1% v/v e 1.000 mg L ⁻¹ Pd (Fonte: DIONÍSIO, 2009)	59
Figura 21. Fórmula química do metano arsenato ácido monossódico (CH ₄ AsO ₃ Na), popularmente conhecido como herbicida Volcane (Fonte: http://www.chem10.com/Article/cp/200912/Article_17604.html).....	66
Figura 22. Diagrama de estabilidade termodinâmica para o As, contendo pH no eixo das abscissas e potencial de óxido-redução, Eh (V), no eixo das ordenadas (Fonte: BROOKINS, 1988)	70
Figura 23. Faixa de sensibilidade do protozoário <i>P. caudatum</i> ao NaCl, onde Tendência central = média dos valores da CL ₅₀ ; Limite superior = valor de dois desvios padrão superiores; Limite inferior = valor de dois desvios padrão inferiores.....	75
Figura 24. Faixa de sensibilidade do cladóceros <i>C. silvestrii</i> ao NaCl, onde Tendência central = média dos valores da CE(I) ₅₀ ; Limite superior = valor de dois desvios padrão superiores; Limite inferior = valor de dois desvios padrão inferiores.....	75

Figura 25. Média de sobrevivência do cladóceros <i>C. silvestrii</i> ao teste de toxicidade com sedimento coletado nas estações seca (24/07/08) e chuvosa (09/03/09) nos diferentes pontos do Ribeirão Guadium, onde * = diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$). Os pontos não amostrados não foram coletados ou as amostras foram perdidas durante o transporte e armazenamento	76
Figura 26. Média de sobrevivência do protozoário <i>P. caudatum</i> ao teste de toxicidade com sedimento coletado nas estações seca (24/07/08) e chuvosa (09/03/09) nos diferentes pontos do Ribeirão Guadium. Os pontos não amostrados não foram coletados ou as amostras foram perdidas durante o transporte e armazenamento	77
Figura 27. Faixa de sensibilidade do protozoário <i>P. caudatum</i> ao arsenito (As^{3+}), de acordo com os valores da CL_{50} ; 2 h obtidos no decorrer de 10 testes, onde Tendência central = média dos valores da CL_{50} ; Limite superior = valor de dois desvios padrão superiores; Limite inferior = valor de dois desvios padrão inferiores.....	87
Figura 28. Faixa de sensibilidade do protozoário <i>P. caudatum</i> ao arsenato (As^{5+}), de acordo com os valores da CL_{50} ; 2 h obtidos no decorrer de 10 testes, onde Tendência central = média dos valores da CL_{50} ; Limite superior = valor de dois desvios padrão superiores; Limite inferior = valor de dois desvios padrão inferiores.....	90
Figura 29. Faixa de sensibilidade do cladóceros <i>C. silvestrii</i> ao arsenito (As^{3+}), de acordo com os valores da $CE(I)_{50}$; 48 h obtidos no decorrer de 10 testes, onde Tendência central = média dos valores da $CE(I)_{50}$; Limite superior = valor de dois desvios padrão superiores; Limite inferior = valor de dois desvios padrão inferiores	94
Figura 30. Faixa de sensibilidade do cladóceros <i>C. silvestrii</i> ao arsenato (As^{5+}), de acordo com os valores da $CE(I)_{50}$; 48 h obtidos no decorrer de 10 testes, onde Tendência central = média dos valores da $CE(I)_{50}$; Limite superior = valor de dois desvios padrão superiores; Limite inferior = valor de dois desvios padrão inferiores	95
Figura 31. Curva analítica de calibração para protozoários, construída com soluções padrão de 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 e 10,0 $\mu g L^{-1}$ As, em meio de 0,014 mol L^{-1} HNO_3	100

Figura 32. Curva analítica de calibração para cladóceros, construída com soluções padrão de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0 e 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ As, em meio de 0,014 mol L^{-1} HNO_3	100
Figura 33. Curva analítica de calibração para cladóceros, construída com soluções padrão de 5; 10; 20; 30 e 40 $\mu\text{g L}^{-1}$ As, em meio de 0,014 mol L^{-1} HNO_3	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Uso das terras por bacia hidrográfica e APP em Piracicaba, São Paulo (Fonte: ATLAS RURAL DE PIRACICABA, 2004).....	34
Tabela 2. Condições operacionais do espectrômetro de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS) (Fonte: DIONÍSIO, 2009)	58
Tabela 3. Programa de aquecimento do espectrômetro de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS) para a determinação de As (Fonte: DIONÍSIO, 2009)	58
Tabela 4. Medições das variáveis dos pontos de coleta do Ribeirão Guadium na estação seca, em 24 de julho de 2008. Não foi possível a coleta do Ponto da Estação de Tratamento de Esgoto (P3)	63
Tabela 5. Medições das variáveis dos pontos de coleta do Ribeirão Guadium na estação chuvosa, em 9 de março de 2009. Não foi possível a medição do Ponto da Estação de Tratamento de Esgoto (P3)	63
Tabela 6. Resolução do CONAMA n° 357/2005.....	64
Tabela 7. Concentrações de As total, As^{3+} e As^{5+} ($mg\ kg^{-1}$) nas amostras de sedimento do Ribeirão Guadium, Piracicaba, São Paulo na estação seca, em 24 de julho de 2008. Os pontos não amostrados não foram coletados ou as análises apresentaram repetições não confiáveis que foram descartadas	66
Tabela 8. Concentrações de As total, As^{3+} e As^{5+} ($mg\ kg^{-1}$) no extrato 1 mol L^{-1} HCl em amostras de sedimento coletadas na estação chuvosa, em 9 de março de 2009. A análise do Ponto do Disque Animais (P5) apresentou repetições não confiáveis que foram descartadas.....	67
Tabela 9. Índice pH x Eh do sedimento de fundo do Ribeirão Guadium na estação chuvosa, em 9 de março de 2009. A análise do Ponto do Disque Animais (P5) apresentou repetições não confiáveis que foram descartadas. pH = potencial hidrogeniônico; Eh = potencial de óxido-redução	71
Tabela 10. Teores de As total ($\mu g\ g^{-1}$) esperado e obtido para o Material de Referência Certificado WQB-1	73
Tabela 11. Concentrações de As total ($\mu g\ L^{-1}$) no sobrenadante das amostras de sedimento (água reconstituída) utilizado com o cladóceros <i>C. silvestrii</i> nas estações de seca (24/07/08) e cheia (09/03/09). Os pontos não amostrados	

não foram coletados ou as amostras foram perdidas durante o transporte e armazenamento	78
Tabela 12. Concentrações de As total ($\mu\text{g L}^{-1}$) no sobrenadante das amostras de sedimento (água Minalba [®] estéril) utilizado com o protozoário <i>P. caudatum</i> nas estações de seca (24/07/08) e cheia (09/03/09). Os pontos não amostrados não foram coletados ou as amostras foram perdidas durante o transporte e armazenamento	79
Tabela 13. Valores de pH, condutividade e dureza nos ensaios de toxicidade aguda com <i>C. silvestrii</i> , utilizando o sobrenadante das amostras de sedimento (água reconstituída) na estação seca, em 24 de julho de 2008. Os Pontos da Nascente (P0) e da Estação de Tratamento de Esgoto (P3) não foram coletados ou as amostras foram perdidas durante o transporte e armazenamento. I = inicial; F = final.....	83
Tabela 14. Valores de pH, condutividade e dureza nos ensaios de toxicidade aguda com <i>C. silvestrii</i> , utilizando o sobrenadante das amostras de sedimento (água reconstituída) na estação chuvosa, em 9 de março de 2009. Os Pontos da Estação de Tratamento de Esgoto (P3) e do Condomínio (P6) não foram coletados ou as amostras foram perdidas durante o transporte e armazenamento. I = inicial; F = final.....	84
Tabela 15. Valores de pH nos ensaios de toxicidade aguda com <i>P. caudatum</i> , utilizando o sobrenadante das amostras de sedimento (água Minalba [®] estéril) nas estações seca (24/07/08) e chuvosa (09/03/09). Os pontos não amostrados não foram coletados ou as amostras foram perdidas durante o transporte e armazenamento. I = inicial; F = final.....	85
Tabela 16. Valores da CL_{50} (mg L^{-1}) As^{3+} e respectivos intervalos de confiança em testes de toxicidade aguda com duração de 2 h, utilizando o protozoário <i>P. caudatum</i>	87
Tabela 17. Mortalidade do protozoário <i>P. caudatum</i> ao As^{3+} durante 24 h	88
Tabela 18. Valores da CL_{50} (mg L^{-1}) As^{3+} e respectivos intervalos de confiança em testes de toxicidade aguda com duração de 24 h, utilizando o protozoário <i>P. caudatum</i>	89
Tabela 19. Valores da CL_{50} (mg L^{-1}) As^{5+} e respectivos intervalos de confiança em testes de toxicidade aguda com duração de 2 h, utilizando o protozoário <i>P. caudatum</i>	90

Tabela 20. Mortalidade do protozoário <i>P. caudatum</i> ao As^{5+} durante 24 h.....	91
Tabela 21. Valores da CL_{50} ($mg L^{-1}$) As^{5+} e respectivos intervalos de confiança em testes de toxicidade aguda com duração de 24 h, utilizando o protozoário <i>P. caudatum</i>	92
Tabela 22. Valores da $CE(I)_{50}$ ($mg L^{-1}$) As^{3+} e respectivos intervalos de confiança em testes de toxicidade aguda com duração de 48 h, utilizando o cladóceros <i>C. silvestrii</i>	94
Tabela 23. Valores da $CE(I)_{50}$ ($mg L^{-1}$) As^{5+} e respectivos intervalos de confiança em testes de toxicidade aguda com duração de 48 h, utilizando o cladóceros <i>C. silvestrii</i>	96
Tabela 24. Teores totais de As bioacumulados, em pg x indivíduo As ou μg^{-1} dw As nos protozoários submetidos a diferentes concentrações de As^{3+} e As^{5+} . *média \pm desvio padrão, n = 3 réplicas; LOD = limite de detecção; dw = peso seco.....	102
Tabela 25. Teores totais absorvidos e adsorvidos, em pg x indivíduo As^{3+} ou μg x g^{-1} dw As^{3+} da penúltima concentração de As^{3+} em protozoários vivos e mortos. *média \pm desvio padrão, n = 3 réplicas; LOD = limite de detecção; dw = peso seco.....	102
Tabela 26. Teores totais absorvidos e adsorvidos, em pg x indivíduo As^{5+} ou μg x g^{-1} dw As^{5+} da penúltima concentração de As^{5+} em protozoários vivos e mortos. *média \pm desvio padrão, n = 3 réplicas; LOD = limite de detecção; dw = peso seco.....	103
Tabela 27. Teores totais de As bioacumulados, em pg x indivíduo As ou μg x g^{-1} dw As nos cladóceros submetidos a diferentes concentrações de As^{3+} e As^{5+} . *média \pm desvio padrão, n = 3 réplicas; LOD = limite de detecção; dw = peso seco.....	104
Tabela 28. Teores totais absorvidos e adsorvidos, em pg x indivíduo As^{3+} ou μg x g^{-1} dw As^{3+} da penúltima concentração de As^{3+} em cladóceros vivos e mortos. *média \pm desvio padrão, n = 3 réplicas; LOD = limite de detecção; dw = peso seco.....	105
Tabela 29. Teores totais absorvidos e adsorvidos, em pg x indivíduo As^{5+} ou μg x g^{-1} dw As^{5+} da penúltima concentração de As^{5+} em cladóceros vivos e mortos. *média \pm desvio padrão, n = 3 réplicas; LOD = limite de detecção; dw = peso seco.....	105

RESUMO

O arsênio é um elemento químico essencial para a vida, ainda que possa apresentar toxicidade em concentrações pouco acima daquelas consideradas essenciais aos organismos. Os testes de Ecotoxicologia Aquática realizados no Brasil geralmente utilizam organismos internacionalmente padronizados, que embora sensíveis, não ocorrem em ecossistemas brasileiros, aumentando a dificuldade de se avaliar os impactos de agentes químicos sobre componentes específicos da biota local. Além disso, as condições dos testes utilizando espécies exóticas, não retratam as encontradas nos ecossistemas tropicais e subtropicais, que apresentam diferentes características abióticas, como por exemplo, condutividade, dureza e temperatura, entre outras variáveis que modificam a resposta dos organismos-teste e a própria toxicidade do agente químico avaliado. Assim sendo, tornam-se relevantes os estudos ecotoxicológicos empregando-se espécies que sejam nativas, objetivando o conhecimento da sensibilidade destas aos diversos agentes tóxicos. O presente trabalho visou avaliar a toxicidade do sedimento do Ribeirão Guamium, bacia do Rio Piracicaba, São Paulo, utilizando-se como organismos-teste o protozoário *Paramecium caudatum* Ehrenberg, 1833 e o cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* Daday, 1902. Para tanto foram conduzidas duas campanhas de amostragem, uma na estação seca e outra na estação chuvosa, em 9 pontos ao longo de toda a extensão deste curso d'água, visando verificar variação espacial em função dos diferentes tipos de uso do solo praticado na bacia. Este substrato foi analisado quanto aos teores de As total, As disponível e de As^{3+} e As^{5+} , relacionando os resultados dos bioensaios com as diferentes frações obtidas do As inorgânico. Considerando-se as alterações do estado de oxidação do elemento pelo manuseio da amostra, para a coleta realizada na estação chuvosa, as porcentagens das frações de As^{3+} e As^{5+} obtidas pelos métodos químicos empregados foram comparadas com aquelas previstas pelo diagrama de estabilidade pH x Eh do elemento. As espécies inorgânicas e o teor total de As foram também determinados no Material de Referência Certificado WQB-1. A toxicidade aguda de soluções de As^{3+} e As^{5+} para o zooplâncton foi determinada utilizando-se os mesmos organismos-teste, quantificando a absorção/adsorção do semi-metal nos organismos

experimentados. As análises químicas das amostras de sedimento resultaram em concentrações de As total, As^{3+} e As^{5+} a níveis tóxicos, especialmente nos Pontos da Nascente (P0), do Bairro de Tanquinho (P1) e do Disque Animais (P5) da microbacia do Ribeirão Guamium, confirmando-se com os pontos nos quais o sobrenadante apresentou maiores concentrações de As total. Os resultados obtidos com a análise do sedimento foram semelhantes aos valores teóricos previstos utilizando o diagrama de estabilidade pH x Eh, o qual indicou predominância da forma As^{5+} . O método de determinação de As total apresentou precisão analítica quando comparado ao Material de Referência Certificado WQB-1, o qual à semelhança das amostras apresentou em seu conteúdo total, diferentes frações de As na sua forma inorgânica. De acordo com o esperado pela literatura, a forma reduzida (As^{3+}) foi mais tóxica do que a forma oxidada (As^{5+}), sendo o organismo *C. silvestrii* mais sensível ao semi-metal arsênio e às amostras de sedimento do que o protozoário *P. caudatum*. Através da técnica de espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite (GFAAS), determinou-se os teores de As nos organismos sobreviventes e, no caso, os mortos da concentração mais alta utilizada. Nos protozoários, os teores bioacumulados variaram de 29,8 a 70,0 pg x indivíduo As^{3+} ou 10,5 a 17,5 $\mu\text{g} \times \text{g}^{-1}$ de peso seco (dw) As^{3+} e de 183,0 a 282,6 pg x indivíduo As^{5+} ou 45,8 a 70,7 $\mu\text{g} \times \text{g}^{-1}$ dw As^{5+} . Já nos cladóceros, os teores variaram de 75,9 a 149,3 pg x indivíduo As^{3+} ou 22,4 a 44,1 $\mu\text{g} \times \text{g}^{-1}$ dw As^{3+} e de 1.575,4 a 1.630,2 pg x indivíduo As^{5+} ou 465,2 a 481,4 $\mu\text{g} \times \text{g}^{-1}$ dw As^{5+} . Mesmo os organismos testados tendo pequeno tamanho e as concentrações utilizadas serem baixas, os mesmos demonstraram ser capazes de associar-se ao As, bioacumulando este semi-metal e serem capazes de exercer importante papel na biodisponibilização deste ao longo da cadeia trófica.

Palavras-chave: As total; As^{3+} e As^{5+} ; Ribeirão Guamium; Sedimento; Zooplâncton; Toxicidade

ABSTRACT

Arsenic is an essential chemical element for life, although it can be extremely toxic at concentrations slightly above those required for living organisms. In Brazil, generally well-standardized internationally test organisms are used in Aquatic Toxicology. Although sensitive, it does not occur in Brazilian ecosystems, increasing the difficulties on assessing the impacts of chemicals on specific niches of the local biota. Furthermore, the toxicity test using exotic species, do not match the tropical and subtropical ecosystems abiotic conditions, which have different characteristics such as conductivity, hardness and temperature, among other variables that modify the response of test organisms and even the own toxicity of the chemical agent. Thus, ecotoxicological assays are of utmost importance when using native species, in order to assess its sensitivity to several toxic agents. The present study was proposed to assess for the toxicity of Guamium River bottom sediment, Piracicaba hydrographic basin, São Paulo, by using test organisms such as *Paramecium caudatum* protozoan Ehrenberg, 1833 and *Ceriodaphnia silvestrii* cladocera Daday, 1902. To reach for these goals two sampling campaigns were carried out, one in the dry season and another during the rainy season, in 9 points through the entire length of the river main channel, to verify spatial variation as a function of different surrounded land use. Sediment samples were analyzed for total and available As, As^{3+} and As^{5+} , relating the obtained data with acute toxicity bioassays results for inorganic As species. Taking into account the modification of As oxidation state by the sample preparation conditions, in the rainy season, analytical results were compared to those predict by the pH x Eh stability diagram. Total and inorganic As species were also determinate in the Certificated Reference Material WQB-1. The acute toxicity of As^{3+} and As^{5+} solutions were evaluated for zooplankton, by using the same test organisms, quantifying the absorption/adsorption of the semi-metal in the experiments organisms. Chemical analysis of sediment samples resulted in toxic levels concentrations of total As, As^{3+} and As^{5+} , especially in the Points of the River's Source (P0), Tanquinho's District (P1) and Dial Animals (P5) of Guamium River, confirming with the points at which the supernatant had higher concentrations of total As. The results obtained from the sediment analysis

were similar to the theoretical values provided using the pH x Eh stability diagram, which indicated prevalence of As^{5+} . The method of determining total As presented analytical precision when it was compared to the Certificated Reference Material WQB-1, which like the samples, presented different fractions of As in its inorganic form. According expected by the literature, the reduced form (As^{3+}) was more toxic than the oxidized form (As^{5+}), and *C. silvestrii* is more sensitive to arsenic and sediment samples than the *P. caudatum*. By spectrometry of atomic absorption technique with electrothermal atomization in graphite furnace (GFAAS) it was determinated As levels in the surviving organisms and in the case, the dead of the highest concentration used. In protozoan, the bioaccumulated levels ranged from 29,8 to 70,0 pg x individual As^{3+} or 10,5 to 17,5 $\mu\text{g} \times \text{g}^{-1}$ of dry weight (dw) As^{3+} and from 183,0 to 282,6 pg x individual As^{5+} or 45,8 to 70,7 $\mu\text{g} \times \text{g}^{-1}$ dw As^{5+} . In cladocera, the levels ranged from 75,9 to 149,3 pg x individual As^{3+} or 22,4 to 44,1 $\mu\text{g} \times \text{g}^{-1}$ dw As^{3+} and from 1.575,4 to 1.630,2 pg x individual As^{5+} or 465,2 to 481,4 $\mu\text{g} \times \text{g}^{-1}$ dw As^{5+} . Even considering both, the tested organisms small size and the low concentrations used, it was possible to associate with As, bioaccumulating this semi-metal and, thus, has an important role in the bioavailability of this along the food chain.

Keywords: Total As; As^{3+} and As^{5+} ; Guamium River; Sediment; Zooplankton; Toxicity

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
1.1. Biomonitoramento da qualidade de ambientes aquáticos.....	21
1.2. Testes de toxicidade com sedimentos	22
1.3. Organismos zooplanctônicos	24
1.4. Elemento químico arsênio.....	25
1.5. Especiação de arsênio	26
1.6. Bioacumulação de metais	28
2. OBJETIVOS	30
2.1. Objetivos gerais	30
2.2. Objetivos específicos	30
3. JUSTIFICATIVAS.....	31
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
4.1. Área de estudo e coletas.....	32
4.2. Análises químicas das amostras de sedimento	41
4.3. Cultivo dos organismos utilizados nos testes de toxicidade.....	43
4.3.1. Cultivo monoxênico do protozoário ciliado <i>Paramecium caudatum</i> .	43
4.3.2. Meio de cultura padrão para cladóceros	45
4.4. Testes de sensibilidade (controle positivo) dos organismos utilizados nos bioensaios.....	47
4.5. Bioensaios - efeitos do arsênio e das amostras de sedimento nas respostas biológicas do protozoário e do cladóceros	48
4.5.1. Bioensaios para verificar a toxicidade das amostras de sedimento .	48
4.5.2. Bioensaios com o protozoário <i>Paramecium caudatum</i> para verificar a toxicidade aguda do arsênio	49
4.5.3. Bioensaios com o cladóceros <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> para verificar a toxicidade aguda do arsênio	51
4.6. Determinação da concentração de As total nos protozoários e cladóceros.....	53
4.6.1. Determinação da concentração de As total no protozoário <i>Paramecium caudatum</i>	56
4.6.2. Determinação da concentração de As total no cladóceros <i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	57

4.6.3. Determinação dos teores totais de arsênio na água de cultivo, no sobrenadante do sedimento e nos organismos-teste	57
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
5.1. Caracterização limnológica dos pontos de coleta	61
5.2. Análises químicas das amostras de sedimento	65
5.3. Testes de sensibilidade (controle positivo) dos organismos utilizados nos bioensaios.....	74
5.4. Bioensaios - efeitos do arsênio e das amostras de sedimento nas respostas biológicas do protozoário e do cladóceros	76
5.4.1. Bioensaios para verificar a toxicidade das amostras de sedimento. 76	
5.4.2. Bioensaios com o protozoário <i>Paramecium caudatum</i> para verificar a toxicidade aguda do arsênio	86
5.4.3. Bioensaios com o cladóceros <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> para verificar a toxicidade aguda do arsênio	93
5.5. Determinação da concentração de As total nos protozoários e cladóceros.....	99
5.5.1. Determinação dos teores totais de arsênio na água de cultivo, no sobrenadante do sedimento e nos organismos-teste	99
5.5.2. Determinação da concentração de As total no protozoário <i>Paramecium caudatum</i>	101
5.5.3. Determinação da concentração de As total no cladóceros <i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	104
6. CONCLUSÕES	107
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas a quantidade de agentes químicos lançados no ambiente tem sido objeto de preocupação. A velocidade com que os ambientes estão sendo impactados pelas atividades humanas tem comprometido os recursos naturais tão necessários ao equilíbrio da biota e manutenção da vida. Um exemplo ocorre com as águas dos rios que devido ao crescimento demográfico e industrial têm sido poluídas pelo lançamento clandestino dos esgotos, por águas contaminadas provenientes da drenagem urbana e pelo lixo informal.

Segundo Petts *apud* Soares (2003), monitoramento é em essência a coleta de dados com o propósito de obter informações sobre uma característica e/ou comportamento de uma variável ambiental. Para esta finalidade, o monitoramento consiste de um programa de repetidas observações, medidas e registros de variáveis ambientais e parâmetros operacionais em um período de tempo para um propósito definido.

1.1. Biomonitoramento da qualidade de ambientes aquáticos

Programas de monitoramento da qualidade das águas que empregam exclusivamente índices físicos e químicos têm sido alvos de críticas severas por vários pesquisadores que apontam a necessidade de se utilizar bioindicadores para obtenção de uma abordagem mais ecossistêmica (ZAGATTO & BERTOLETTI, 2006). Isso por que a biota reflete a integridade ecológica (integridade física, química e biológica) dos ecossistemas, evidenciando os efeitos dos diferentes agentes estressores e fornecendo uma medida agregada dos impactos (BARBOUR et al., 1999). Além disso, as comunidades biológicas de ecossistemas aquáticos apresentam adaptações evolutivas a condições ambientais e apresentam limites de tolerância a diferentes alterações das mesmas (ALBA-TERCEDOR, 1996).

O monitoramento da qualidade de ambientes aquáticos utilizando bioindicadores e análises físico-químicas, em paralelo, é amplamente utilizado em países desenvolvidos, tendo sido incluído em normas técnicas nacionais em vários países da Europa, como na Alemanha através da DIN (1990) e nos

EUA (USEPA, 1996). Atualmente, o Brasil é um dos líderes mundiais nesse tipo de pesquisa, entretanto, são escassos os trabalhos publicados na área.

O biomonitoramento realizado em bacias hidrográficas acusa alterações nas condições limnológicas dos rios, as quais não podem ser detectadas apenas por monitoramentos físico-químicos da água, sobretudo ao se considerar que existem mais de 11 milhões de substâncias químicas registradas no CAS (Chemical Abstracts Service), que podem potencialmente atingir o ambiente. Mesmo em laboratórios bem equipados, podem ser rotineiramente analisadas no máximo entre 250 a 300 substâncias isoladamente, sem contar ainda os efeitos como, por exemplo, os sinérgicos e antagônicos, que muitas vezes têm maior importância do que a grandeza absoluta de uma substância isolada. Portanto, em rios pouco a mediamente poluídos, são estimadas a presença de 30 a 100 mil substâncias na água. Para as águas é válida a frase de Aristóteles: “O todo é mais do que a soma de suas partes”. Por isso, o uso dos organismos bioindicadores para aferir a qualidade das águas, uma vez que os mesmos indicam, integralmente, os efeitos produzidos por todas as substâncias existentes na água, incluindo as substâncias novas, que surgem a partir de interações entre elementos que se subtraem à análise química (FATMA/GTZ,1999).

1.2. Testes de toxicidade com sedimentos

Os testes de toxicidade com sedimentos fornecem informações ambientais importantes que podem ser utilizadas para indicar a participação deste compartimento no estabelecimento da qualidade de água de um corpo hídrico, bem como revelar locais mais contaminados (ROSIU et al., 1989).

O sedimento é um substrato que abriga interna e externamente uma vasta variedade de organismos. Atua também como depósito de descartes e sumidouro de contaminantes, incluindo metais tóxicos e pesticidas. Contaminantes são transportados dos continentes para os oceanos em solução ou aderidos à matéria suspensa, podendo ser estocados temporariamente ou de modo permanente nos sedimentos de rios, lagos e águas costeiras. A acumulação permanente do contaminante causa problemas devido à liberação

de poluentes ao longo do tempo, mesmo após a fonte de poluição ter sido eliminada (SALOMONS et al., 1987 *apud* JARDIM, 2004).

Em diferentes tipos de sedimento, concentrações iguais de um mesmo contaminante podem apresentar diferentes graus de toxicidade. Um sedimento pode ser muito tóxico e outro pode não apresentar nenhuma toxicidade para os mesmos organismos, sendo que ambos contêm a mesma concentração do contaminante. Para resultar em toxicidade, o contaminante deve estar biodisponível e isso significa que a presença de altas concentrações de poluentes nos sedimentos não necessariamente resulta em toxicidade aos organismos bentônicos ou da coluna d'água (JARDIM, 2004). Por exemplo, metais adsorvidos nas entrecamadas de argilas, precipitados com carbonatos, ligados a óxidos ou complexados pela matéria orgânica podem ser considerados menos biodisponíveis, dependendo da combinação das propriedades químicas e físicas do solo (SPOSITO et al., 1982).

Assim, os testes de toxicidade servem de instrumento à melhor compreensão e fornecimento de respostas às ações que vêm sendo empreendidas no sentido de se reduzir a toxicidade do despejo líquido, de seu efeito sobre o corpo receptor, e, em última instância, promover a melhoria da qualidade ambiental. Estes ensaios consistem na determinação do potencial tóxico de um agente químico ou de uma mistura complexa, pelos efeitos desses poluentes em organismos vivos. Nos testes de toxicidade são utilizadas as denominações agudo, crônico e não tóxico, para eventuais descrições dos efeitos deletérios sobre os organismos aquáticos. O efeito agudo é caracterizado por uma resposta severa e rápida a um estímulo, a qual se manifesta nos organismos aquáticos em tempos relativamente curtos (0 a 96 horas), sendo o efeito morte o mais observado. O efeito crônico caracteriza-se pela resposta a um estímulo que continua por longos períodos de exposição do organismo ao poluente (1/10 do ciclo vital até a totalidade da vida do organismo), que pode ser expressa através de mudanças comportamentais, alterações fisiológicas, genéticas e de reprodução, entre outros. Quando da ocorrência de eventos caracterizando efeito agudo ou crônico nas amostras de água coletadas, pode-se considerar que os respectivos corpos de água que estão sendo avaliados não apresentam condições adequadas para a manutenção da vida aquática (IGAM, 2004).

1.3. Organismos zooplanctônicos

Os organismos zooplanctônicos são comumente utilizados em testes de toxicidade principalmente pelo fato de serem espécies-chave em ecossistemas lacustres, assumindo a importante função de elo de transferência de metais e outros elementos ao longo das cadeias alimentares aquáticas. Eles fazem parte do plâncton, juntamente com os vírus, bactérias, fungos e microalgas. O zooplâncton, em ambientes de água doce, é composto majoritariamente por protozoários, rotíferos, cladóceros e copépodos. São animais que vivem em suspensão na água e apresentam capacidade de locomoção limitada, estando sujeitos à dispersão por turbulência e outros movimentos da água, embora rotíferos, microcrustáceos como cladóceros e larvas de insetos possam percorrer distâncias consideráveis em águas calmas. A comunidade zooplanctônica é composta por organismos com grande sensibilidade ambiental e responde a diversos tipos de impactos, tanto pela alteração na quantidade dos organismos quanto na composição e diversidade da comunidade (COELHO-BOTELHO, 2004).

Os Cladocera, ou pulgas d'água fazem parte do zooplâncton de água doce, possuindo grande representatividade nos corpos de água lênticos em todo o mundo e também no Brasil. Estimativas conservadoras apontam cerca de 600 espécies ocorrendo em todo o mundo (KOROVCHINSKY, 1996); e estima-se que cerca de 150 espécies ocorram no Brasil. A maioria das espécies de Cladocera alimenta-se através da filtração de partículas alimentares em suspensão na água, constituídos principalmente por bactérias, algas unicelulares, fungos e detritos. Segundo Bernardi et al. (1987), os cladóceros são muito importantes na transferência de energia através da cadeia alimentar de ambientes lênticos, já que possuem curto tempo de geração e alta eficiência reprodutiva, estando entre as presas mais visadas do zooplâncton, tanto por vertebrados quanto por invertebrados e sua exclusão das cadeias alimentares pode interferir negativamente na qualidade de corpos d'água.

Os protozoários são também organismos zooplanctônicos e embora sejam unicelulares eucariontes, possuem uma considerável diversidade morfológica e fisiológica, apresentando um notável espectro de adaptações

para diferentes condições ambientais, ocupando uma grande variedade de nichos ecológicos. Eles ocorrem em todas as latitudes, no mar, inclusive a profundidades de até 4.500 m (TURLEY et al., 1988), em águas doces, salobra e subterrânea, em fontes termais e no solo, podendo ser livres, parasitas, mutualistas ou comensais em plantas e animais (GODINHO & REGALI-SELEGHIM, 1999).

No Brasil, durante muitos anos, deu-se importância quase que exclusiva aos protozoários parasitas, negligenciando-se as espécies de vida livre, apesar do importante papel que as mesmas desempenham nas cadeias tróficas de ambientes naturais, nos processos de autopurificação em estações de tratamento de água e de dejetos de esgoto e como indicadores biológicos de qualidade de água (GODINHO & REGALI-SELEGHIM, 1999). Devido à sua sensibilidade a alterações ambientais, ao seu curto ciclo de vida, facilidade para cultivo e manutenção, os protozoários têm sido utilizados em estudos toxicológicos e propostos como indicadores biológicos de poluição aquática (NICOLAU et al., 1999; NALECZ-JAWECKI & SAWICKI, 2002; DIAS et al., 2003; NALECZ-JAWECKI, 2004).

1.4. Elemento químico arsênio

No ambiente aquático, determinados poluentes como os metais estão sujeitos a diferentes processos: interações iônicas, precipitação, co-precipitação, como no caso do As com o Fe (BUFFLE & VITRE, 1994), acúmulo no sedimento, absorção e adsorção por organismos dentro da cadeia alimentar. As principais causas de preocupação em relação à presença de metais no ambiente são a persistência, bioacumulação e toxicidade. A ação tóxica resulta da afinidade dos metais por certas moléculas biologicamente importantes, tais como proteínas, e pelo fato de poderem competir com nutrientes no interior das células. O estudo da acumulação de metais em organismos vem do interesse em se conhecer o destino e os caminhos traçados por esses elementos químicos até o topo das cadeias tróficas (SANTOS, 2004).

Dentre as espécies químicas inorgânicas, o arsênio é conhecido por ser um agente tóxico, mesmo a concentrações baixas. Este elemento se encontra

naturalmente na crosta terrestre, podendo estar combinado ao Mn, Fe, Co, Ni, Ag e Sn na forma de compostos inorgânicos ou combinado ao carbono para formar compostos orgânicos, como arsenobetaina e arseno-açúcares, em plantas e animais (BARRA et al., 2000).

O As pode ser introduzido no ambiente por processos geológicos naturais, pelo uso de herbicidas e preservantes de madeira ou pela manufatura de vidros e materiais semicondutores. Por essas razões é considerado um poluente de importância, podendo atingir as águas e os alimentos em quantidades significativas e, conseqüentemente, afetar a população via cadeia alimentar (SANTOS & JACOB, 2005). Ocorre na natureza em diferentes estados de oxidação, dando origem a vários compostos. A toxicidade do As depende, dentre outros fatores, da sua forma química e da concentração (PATRA et al., 2004; LEAL et al., 2006). As formas químicas incluem espécies químicas inorgânicas como o arsenato (As^{5+}) e o arsenito (As^{3+}), e orgânicas como a arsenobetaina e a arsenocolina. As formas mais tóxicas são as inorgânicas (BARRA et al., 2000). Na água, são encontradas as formas inorgânicas e orgânicas (BAIRD, 2002).

O As está entre os elementos químicos mais nocivos à saúde humana, sendo comparado ao mercúrio, ao chumbo e ao cádmio. Em concentrações elevadas (acima de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ na água, segundo a Organização Mundial da Saúde), pode provocar vários tipos de câncer, como o de pele, pâncreas e pulmão, além de abalos ao sistema nervoso, malformação neurológica e abortos (BAIRD, 2002). Ainda que o As e seus compostos sejam extremamente tóxicos, este semi-metal é essencial para a vida, pois é requerido em pequenas quantidades por plantas e animais para que completem seu ciclo vital. Apesar desta realidade, trabalhos relacionados à ocorrência e à ecotoxicidade deste elemento são ainda escassos (CHOUERI, 2004; SANTOS, 2006).

1.5. Especificação de arsênio

Especificação é a determinação da concentração das diferentes formas químicas de um elemento, sendo que estas espécies, somadas, constituem a concentração total do elemento na amostra. Anteriormente, a determinação da concentração total de um dado elemento era suficiente para permitir

considerações clínicas e ambientais. Embora o conhecimento da concentração total de um elemento ainda seja de utilidade, é essencial, em muitas situações, a determinação das formas químicas nas quais o elemento ocorre (VAN LOON & BAREFOOT, 1992).

Segundo Florence (1982), daquela época até nossos dias, sabe-se das dificuldades envolvidas na concretização da análise de especiação química de um elemento. E isto, sobretudo, porque o potencial de alteração das condições de equilíbrio existente em uma amostra, seja ela líquida, sólida ou gasosa é elevado (PICKERING, 1995). Esta afirmação é muito adequada para o tipo de amostra desta pesquisa, o sedimento, pois as alterações de equilíbrio são de particular importância no estágio de amostragem. Tanto que este aspecto mereceu detalhada discussão na literatura (MUDROCH & AZCUE, 1995). Devido a isso, sabe-se que a coleta, o tratamento e a preservação das amostras para a determinação qualitativa e quantitativa com vistas à especiação química do elemento é diferente dos procedimentos empregados para a determinação total (BARRA et al., 2000). Essas considerações são muito pertinentes para um elemento como o As, que pode ocorrer na natureza formando 20 compostos, sendo os mais comuns nos estados de oxidação As^{5+} , As^{3+} , As^{3-} e As^0 , e como MMA e DMA, sendo sua química influenciada pelo Fe e pelo S (VAN LOON & BAREFOOT, 1992).

A questão da especiação química para o As reveste-se de grande importância, uma vez haver diferenças significativas na toxicidade das diferentes formas do elemento, sendo as formas inorgânicas mais tóxicas do que as orgânicas. Dentre estas, a toxicidade do As^{3+} é significativamente mais elevada do que a toxicidade do As^{5+} (PATRA et al., 2004).

A técnica de espectrometria de fluorescência atômica se baseia na propriedade que certos átomos possuem de emitir radiação ou luminescência quando caem a níveis energéticos mais baixos, após terem sido excitados a altos níveis de energia, através da radiação eletromagnética emitida por uma lâmpada específica do elemento. Essa interação da energia emitida pela lâmpada ocorre com o átomo em fase gasosa. A luz emitida em ambiente de argônio é detectada por uma fotomultiplicadora, gerando-se a ampliação do sinal, proporcional à concentração do elemento de interesse. Esta é uma técnica de alta sensibilidade, sendo linear em ampla faixa de concentração (ppt

- ppm), tendo larga aplicação para análises de elementos formadores de hidretos ou vapor frio, como o Hg. Dentre os formadores de hidretos, destacam-se o As, Se, Bi, Sb e Te (CLESCERL et al., 2005). Pode ser utilizada em uma ampla variedade de tipos de amostras de origem agrícola, médica e ambiental, e vem sendo utilizada, com excelente relação custo/benefício quando comparada com outras técnicas como, por exemplo, a espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS).

A importância da especiação de As se deve ao fato desta fornecer informações sobre essencialidade, toxicidade e permitir o entendimento das reações químicas e bioquímicas relacionadas ao elemento. A concentração total não fornece informações sobre mobilidade, biodisponibilidade, impacto sobre ecossistemas e impacto sobre organismos vivos, incluindo o homem (BARRA et al., 2000).

1.6. Bioacumulação de metais

Os microrganismos têm despertado a atenção de pesquisadores pela capacidade superior de sorção (absorção e/ou adsorção) de metais pela sua biomassa em comparação com outros sorventes inorgânicos e orgânicos (KUREK et al., 1982). Estudos têm demonstrado que, na maior parte dos casos, a bioacumulação de metais por microrganismos se deve a fenômenos de superfície (adsorção e/ou precipitação) (BEVERIDGE, 1989; SHOKOHIFARD et al., 1990; COLLINS & STOTZKY, 1992).

As microalgas, na base das cadeias alimentares aquáticas, adsorvem metais em sua superfície os quais podem ser liberados no trato digestivo dos consumidores. Como membros intermediários na cadeia alimentar aquática, o zooplâncton desempenha um importante papel na acumulação e na transferência trófica de metais tóxicos para níveis tróficos superiores (NOGUEIRA et al., 2005).

A espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS) é o método de análise usado para determinar qualitativamente e quantitativamente a presença de metais. O método consiste em determinar a presença e a quantidade de um determinado metal em uma solução qualquer, usando como princípio a absorção de radiação ultravioleta por parte dos elétrons. Os elétrons

ao sofrerem um salto quântico depois de devidamente excitados por uma fonte de energia, no caso a atomização eletrotérmica em forno de grafite, a cerca de 2.000 °C devolvem a energia recebida para o meio, voltando assim para a sua camada orbital de origem (FRESCHI et al., 2000).

Assim, este trabalho visou analisar o arsênio, dando ênfase às formas inorgânicas do elemento e avaliar sua toxicidade em amostras de sedimento da microbacia do Ribeirão Guamium, bacia do Rio Piracicaba, São Paulo, utilizando organismos zooplancctônicos (um protozoário e um cladóceros). Foram também feitos ensaios de toxicidade aguda para As^{3+} e As^{5+} , avaliando-se a absorção/adsorção do semi-metal em suas diferentes formas nesses mesmos organismos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

O objetivo geral deste estudo foi avaliar a ocorrência e as concentrações de arsênio no sedimento da bacia do Ribeirão Guamium em uma abordagem temporal e espacial. Foi também investigada a toxicidade aguda e a bioconcentração deste semi-metal nas formas de As^{3+} e As^{5+} para o protozoário (*Paramecium caudatum*) e para o cladóceros (*Ceriodaphnia silvestrii*) em condições de laboratório.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar a toxicidade aguda do As^{3+} e As^{5+} para o protozoário e o cladóceros estudados.
- Determinar a toxicidade de amostras de sedimento coletadas ao longo do Ribeirão Guamium.
- Determinar a concentração de As total bioacumulado nos organismos utilizados nos testes de toxicidade.
- Determinar a concentração de As biodisponível e/ou As total no sedimento do Ribeirão Guamium em duas coletas, uma na estação de seca e outra na estação de cheia.
- Determinar a concentração de As total no sobrenadante do sedimento do Ribeirão Guamium nas coletas realizadas nas estações de seca e cheia.
- Relacionar as concentrações de As encontradas no sedimento com as atividades antrópicas desenvolvidas na área de entorno da microbacia.
- Avaliar o potencial das análises químicas estabelecidas para as espécies de As inorgânico no sedimento e sua correspondência com a toxicidade obtida nos bioensaios.
- Comparar as formas de As inorgânico obtidas pelos métodos químicos empregados com aquela predominante esperada para o elemento, segundo o diagrama de estabilidade pH x Eh.

3. JUSTIFICATIVAS

Atuando como corpos receptores de efluentes domésticos e industriais, os ecossistemas aquáticos têm recebido grande quantidade de contaminantes oriundos da crescente atividade antrópica, dentre os quais se encontram os metais tóxicos. Em virtude da estreita interação dos organismos aquáticos com o meio, a bioacumulação e a biomagnificação desses metais nas cadeias tróficas podem induzir toxicidade à biota, podendo afetar o homem. Portanto, estudos ecofisiológicos envolvendo indivíduos dos primeiros níveis tróficos fornecem indicações sobre os efeitos desses agentes estressores ao ambiente.

Devido à sua importância e ao elevado grau de deterioração em que se encontra, a microbacia do Ribeirão Guamium havia sido recentemente incorporada ao programa de recomposição florestal de áreas permanentes (APP) para o Estado de São Paulo, da Organização Não Governamental S.O.S. Mata Atlântica, onde já se deu início as atividades de preparo do solo e plantio de 84.000 mudas de espécies de árvores nativas. Assim, considerando-se que a formação dessa zona de proteção do corpo d'água deva ocorrer em um intervalo de tempo de aproximadamente 3 anos, este projeto se inseriu de grande valia científica como um banco de dados de máxima relevância, que evidenciará futuramente o papel protetor e restaurador das APP no ecossistema considerado.

Como informações sobre a qualidade ambiental da área de estudo eram inexistentes, nada se conhecia sobre a ocorrência e a distribuição do arsênio ou outros elementos tóxicos. Estas poderiam ser de origem natural, causada pelas indústrias de grande porte localizadas em seu entorno, e também por atividades agrícolas agravadas pela ausência de APP. Existiam evidências de que isso poderia ocorrer pelas atividades antrópicas existentes na área de entorno da bacia, e também por um caso documentado de contaminação antrópica por As, em uma área próxima à microbacia, na qual já havia sido verificada a presença do elemento no lençol freático, sendo que a CETESB interditou esta área. A origem das altas concentrações de As se deu pela deposição de resíduos de siderurgia e metalurgia nesta área agrícola.

Do ponto de vista da contaminação difusa, faz-se importante mencionar o largo uso do herbicida Volcane ($\text{CH}_4\text{AsO}_3\text{Na}$) na região, que possui As em sua

molécula, o qual é empregado em pós-emergência na cultura da cana-de-açúcar, há mais de 20 anos. Esta cultura representa 78% do uso do solo na microbacia em estudo.

Considerando-se que o estabelecimento da qualidade de um corpo d'água deve levar em conta o seu sedimento e que a toxicidade é função do estado de oxidação do elemento químico e não de seu teor total, esse trabalho se propôs a determinar as espécies químicas de arsênio que compõem sua fração inorgânica, empregando-se métodos tradicionais de análise e relacionar com os valores de toxicidade obtidos para espécies nativas do zooplâncton. A análise da bioconcentração desse elemento nos organismos zooplanctônicos visou avaliar o impacto do mesmo na rede trófica aquática do ambiente estudado.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Área de estudo e coletas

A microbacia do Ribeirão Guamium, com 7.051 ha, encontra-se totalmente inserida no município de Piracicaba (Tabela 1), São Paulo, sendo classificada entre aquelas que necessitam recuperação emergencial (Figura 1).

De acordo com a Tabela 1, a maior parte do solo desta microbacia tem uso rural, com 5.477 ha (78% da área) com cultivo de cana-de-açúcar, 491 ha de florestas remanescentes e 243 ha de Áreas de Preservação Permanente (APP). A parte urbana da bacia é mista, permitindo o uso residencial, comercial e industrial. Dentre as indústrias, existem algumas de grande porte, como a Arcelor Mittal, siderúrgica produtora de aço; Klabin Papel e Celulose, maior produtora, exportadora e recicladora de papéis do Brasil; e a Metalúrgica Santin, especializada em serviços de usinagem em geral.

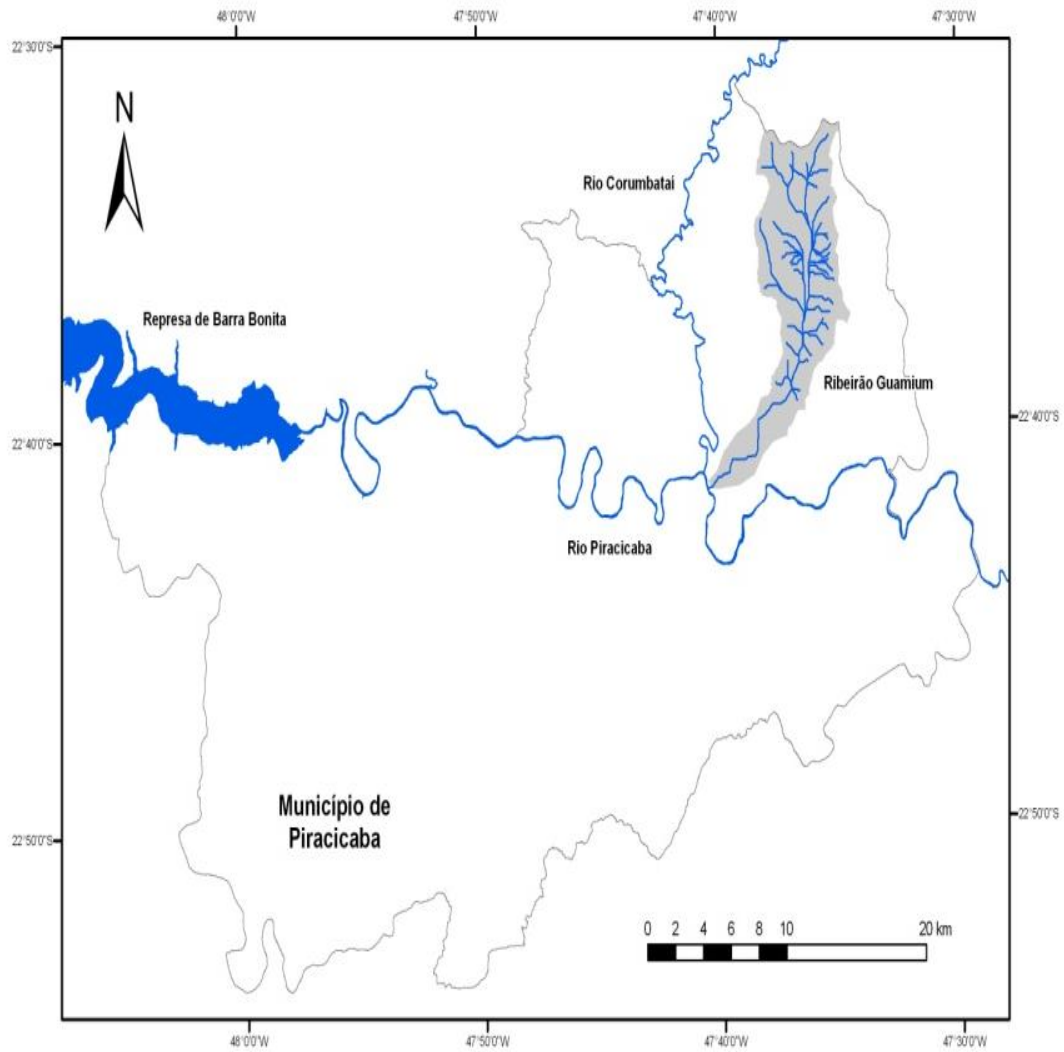


Figura 1. Vista geral do Ribeirão Guamium e sua inserção junto à bacia hidrográfica do Rio Piracicaba, SP (Adaptado do Projeto Aguamium, FEHIDRO - PCJ, Bacias Hidrográficas dos Rios Piracicaba, Capivari e Jundiáí, Piracicaba, São Paulo)

Tabela 1. Uso das terras por bacia hidrográfica e APP em Piracicaba, São Paulo (Fonte: ATLAS RURAL DE PIRACICABA, 2004)

Bacia Hidrográfica	Área da bacia em Piracicaba		Cana		Pasto		Floresta Remanescente		Áreas em Regeneração Natural		Floresta Exótica		Urbano		Água		Outros		APP	
	ha	%	ha	%	ha	%	ha	%	ha	%	ha	%	ha	%	ha	%	ha	%	ha	%
Córrego Capim Fino	1.627	100	1.404	86%	38	2%	86	5%	83	5%	0	0%	3	0%	14	1%	0	0%	76	5%
Córrego da Pinga	2.881	95	754	26%	1.701	59%	95	3%	136	5%	0	0%	0	0%	6	0%	189	7%	109	4%
Córrego das Flores	619	100	160	26%	323	52%	55	9%	80	13%	0	0%	0	0%	1	0%	0	0%	96	15%
Córrego do Ceveiro	2.180	100	1.722	79%	126	6%	179	8%	132	6%	0	0%	0	0%	22	1%	0	0%	271	12%
Córrego do Tanque	765	47	463	61%	4	1%	264	35%	23	3%	0	0%	0	0%	10	1%	0	0%	33	4%
Córrego Godinho	2.239	100	1.656	74%	334	15%	78	3%	153	7%	0	0%	0	0%	19	1%	0	0%	142	6%
Córrego Tamandupá	1.338	100	666	50%	118	9%	395	29%	155	12%	0	0%	0	0%	4	0%	0	0%	91	7%
Ribeirão Anhumas	7.538	100	2.516	33%	2.625	35%	1.221	16%	1.083	14%	0	0%	0	0%	55	1%	38	1%	673	9%
Ribeirão Boa Vista	2.025	69	1.790	88%	26	1%	133	7%	55	3%	0	0%	0	0%	20	1%	0	0%	60	3%
Ribeirão Cachoeira	1.334	100	1.024	77%	181	14%	29	2%	85	6%	0	0%	0	0%	14	1%	0	0%	199	15%
Ribeirão Cachoeira e Paramirim	2.667	37	2.301	86%	65	2%	194	7%	81	3%	0	0%	0	0%	26	1%	0	0%	140	5%
Ribeirão Claro	3.223	100	294	9%	2.059	64%	512	16%	344	11%	0	0%	0	0%	3	0%	11	0%	252	8%
Ribeirão Congonhal	8.302	90	2.855	34%	3.558	43%	741	9%	1.096	13%	0	0%	0	0%	50	1%	3	0%	891	11%
Ribeirão da Estiva	2.748	100	228	8%	1.638	60%	492	18%	361	13%	0	0%	0	0%	8	0%	21	1%	218	8%
Ribeirão da Jibóia	10.399	100	4.203	40%	3.301	32%	1.379	13%	1.465	14%	0	0%	0	0%	49	0%	2	0%	1.175	11%
Ribeirão da Voçoroca	2.531	100	885	35%	1.013	40%	280	11%	291	12%	1	0%	0	0%	11	0%	49	2%	238	9%
Ribeirão das Palmeiras	907	37	822	91%	2	0%	52	6%	26	3%	0	0%	0	0%	4	0%	1	0%	42	5%
Ribeirão do Enxofre	1.797	100	426	24%	210	12%	58	3%	115	6%	0	0%	977	54%	11	1%	0	0%	155	9%
Ribeirão do Matão	1.203	45	941	78%	59	5%	142	12%	53	4%	0	0%	0	0%	7	1%	0	0%	148	12%
Ribeirão do Paredão Vermelho	4.930	100	1.827	37%	1.413	29%	818	17%	433	9%	420	9%	0	0%	16	0%	3	0%	317	6%
Ribeirão do Pau Dalho	3.648	100	1.029	28%	1.653	45%	464	13%	481	13%	0	0%	0	0%	17	0%	4	0%	368	10%
Ribeirão Dois Córregos	2.818	100	1.540	55%	109	4%	269	10%	140	5%	0	0%	726	26%	34	1%	0	0%	160	6%
Ribeirão dos Marins	5.983	100	2.964	50%	1.563	26%	494	8%	763	13%	0	0%	163	3%	35	1%	1	0%	590	10%
Ribeirão dos Patos	5.001	100	1.028	21%	2.190	44%	730	15%	871	17%	0	0%	0	0%	12	0%	171	3%	366	7%
Ribeirão dos Pintos	3.009	76	286	10%	1.725	57%	457	15%	500	17%	0	0%	0	0%	15	1%	26	1%	274	9%
Ribeirão dos Ponces	1.851	34	952	51%	722	39%	35	2%	137	7%	0	0%	0	0%	4	0%	1	0%	210	11%
Ribeirão Granal	1.055	100	692	66%	235	22%	35	3%	77	7%	0	0%	0	0%	17	2%	0	0%	123	12%
Ribeirão Guadium	7.051	100	5.477	78%	182	3%	491	7%	330	5%	0	0%	485	7%	85	1%	1	0%	243	3%
Ribeirão Itapeva	678	100	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	678	100%	0	0%	0	0%	0	0%
Ribeirão Limoeiro	2.154	58	928	43%	683	32%	199	9%	337	16%	0	0%	0	0%	8	0%	0	0%	286	13%
Ribeirão Pau Dalhinho	1.437	100	969	67%	254	18%	64	4%	136	9%	0	0%	0	0%	12	1%	1	0%	145	10%
Ribeirão Pedemeiras	2.194	30	816	37%	848	39%	124	6%	397	18%	0	0%	0	0%	9	0%	1	0%	276	13%
Ribeirão Piracicamirim	5.465	42	2.809	51%	271	5%	318	6%	245	4%	0	0%	1.784	33%	35	1%	3	0%	307	6%
Ribeirão Tijuco Preto	4.400	47	3.036	69%	241	5%	370	8%	315	7%	205	5%	142	3%	90	2%	3	0%	282	6%
Rio Corumbataí	7.088	100	4.015	57%	503	7%	1.004	14%	598	8%	0	0%	594	8%	372	5%	2	0%	504	7%
Rio Piracicaba	19.986	100	7.966	40%	4.549	23%	1.250	6%	1.484	7%	1	0%	2.300	12%	2.404	12%	32	0%	1.821	9%
Rio Tietê	3.467	100	1.534	44%	443	13%	221	6%	263	8%	0	0%	0	0%	642	19%	365	11%	282	8%
Total	138.538		62.978	45%	34.965	25%	13.725	10%	13.323	10%	627	0%	7.851	6%	4.140	3%	930	1%	11.566	8%

Em um total de 9 pontos sequencialmente dispostos no canal principal (Fig. 2), duas amostragens foram efetuadas no período de 1 ano, sendo uma na estação seca, em 24 de julho de 2008 e outra na estação chuvosa, em 9 de março de 2009. Com esta abrangência foram sendo monitoradas áreas de drenagem com características distintas que compõem a bacia hidrográfica do Ribeirão Guamium, como área moderadamente urbanizada pelo Distrito de Tanquinho (Pontos 0 e 1); área industrializada e com forte pressão urbana no trecho final da bacia (Pontos 6, 7 e 8) e, em posição intermediária, área de vocação fortemente agrícola, com predominância da lavoura canavieira e pastagens no trecho médio da bacia (Pontos 2, 3, 4 e 5). Os 9 pontos de amostragem correspondem ao Ponto da Nascente (P0), Ponto do Bairro de Tanquinho (P1), Ponto da Usina Capuava (P2), Ponto da Estação de Tratamento de Esgoto São Jorge (P3), Ponto da Fazenda da APTA (P4), Ponto do Disque Animais (P5), Ponto do Condomínio (P6), Ponto do Clube Atlético (P7), e Ponto do Matadouro (P8).



Figura 2. Bacia do Ribeirão Guamium contendo os respectivos pontos de coleta (Fonte: Google Earth)

Os pontos amostrados foram selecionados, tendo início no Ponto 0 (22° 33' 18.49" S; 47° 35' 56.08" O), sendo este o mais próximo da nascente. Neste local foi encontrada uma maior quantidade de vegetação natural em relação aos outros pontos, porém há uma vasta área no entorno com plantio de cana-de-açúcar ameaçando a nascente.

O Ponto 1 (22° 34' 04.93" S; 47° 36' 14.53" O) está localizado em Tanquinho, um pequeno bairro de Piracicaba com aproximadamente 2.000 moradores (SECRETARIA DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA, 2010). O acesso ao ponto de coleta foi cedido com autorização do proprietário do terreno, no qual o Ribeirão se encontrava repleto de vegetação aquática conhecida como taboa.

Após o bairro de Tanquinho, a uma distância aproximada de 6 km, encontra-se o Ponto 2 (22° 37' 24.81" S; 47° 36' 25.86" O), área rural na qual o corpo d'água se encontra extremamente dominado pelo plantio de cana-de-açúcar, nos arredores da Usina Capuava Ltda (Fig. 3).

Na entrada da captação de água do Ribeirão Guamium, local de estação de tratamento de esgoto (ETE) São Jorge, está localizado o Ponto 3 (22° 39' 54.72" S; 47° 38' 08.55" O), como pode ser visto na Fig. 4. Esta estação se destina ao tratamento primário, com uso de aguapé, e o entorno é caracterizado pela presença de cana-de-açúcar e pouca vegetação arbustiva.

O Ponto 4 (22° 40' 35.81" S; 47° 38' 31.54" O) está localizado na Fazenda do Estado - APTA, no bairro Vila Fátima, área que se encontra em processo de recuperação da mata ciliar com plantio de mudas, sob encargo da Organização Não Governamental S.O.S. Mata Atlântica. Nesta área, observaram-se vestígios da ocupação de capivaras, além de vegetação aquática com predomínio de taboa e, ao redor, plantações de cana-de-açúcar.

Na mesma Fazenda da APTA, temos o Ponto 5 (22° 40' 57.25" S; 47° 38' 57.93" O), local de pouca vegetação arbustiva e com presença de cana-de-açúcar (Fig. 5). Esta área é utilizada pela prefeitura como abrigo para animais de grande porte, os quais são abandonados nas ruas, sendo popularmente chamada de Disque Animais.

O Ponto 6 (22° 40' 56.67" S; 47° 39' 13.19" O) está situado ao lado de um condomínio, sendo este o ponto inicial das atividades urbanas mais intensas (Fig. 6). Aparentemente a água está em bom estado, com aparência incolor e

há uma boa aeração local, devido à presença de rochas e vestígios de vegetação arbustiva.

O Ponto 7 (22° 41' 17.40" S; 47° 39' 52.25" O) se encontra após o bairro Vila Industrial, próximo à Metalúrgica Santin Ltda. Este possui aproximadamente 1 km de distância do ponto anterior, sendo notória a presença de lixos nas margens do Ribeirão, ocasionando assim águas sujas e fortes odores.

As mesmas condições de poluição do ponto anterior foram encontradas no Ponto 8 (22° 41' 24.19" S; 47° 40' 21.66" O), situado próximo ao Rio Piracicaba e do antigo matadouro (Fig. 7).



Figura 3. Ponto de coleta da Usina Capuava (P2), área rural na qual o corpo d'água se encontra extremamente dominado pelo plantio de cana-de-açúcar (Foto: Cleber Valim Alexandre)



Figura 4. Ponto de coleta da Estação de Tratamento de Esgoto São Jorge (P3), local caracterizado pela presença de cana-de-açúcar e pouca vegetação arbustiva (Foto: Cleber Valim Alexandre)



Figura 5. Ponto de coleta do Disque Animais (P5), localizado à montante da represa do Ribeirão Guamium, área de pouca vegetação arbustiva e com presença de cana-de-açúcar (Foto: Cleber Valim Alexandre)



Figura 6. Ponto de coleta do Condomínio (P6), ponto inicial das atividades urbanas mais intensas (Foto: Cleber Valim Alexandre)

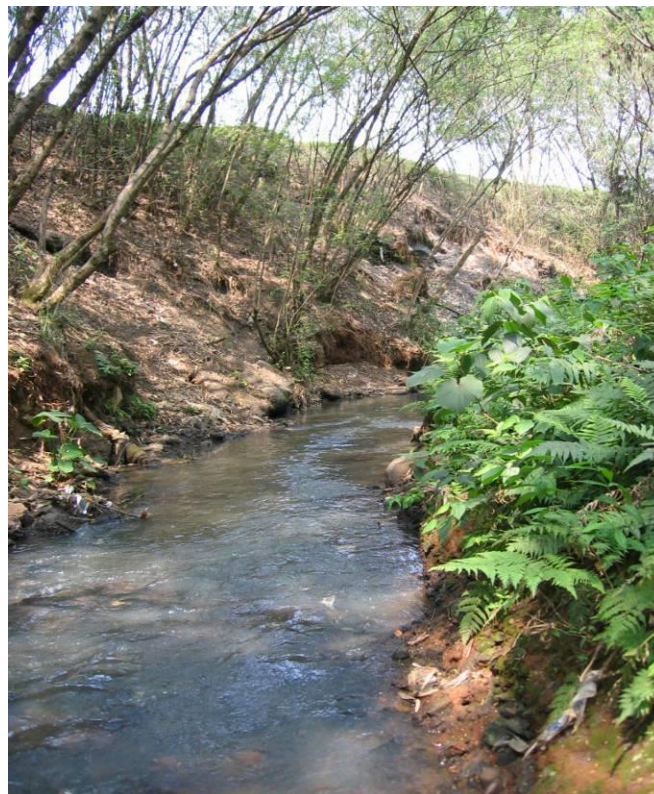


Figura 7. Ponto de coleta do Matadouro (P8), situado próximo ao Rio Piracicaba, com notória presença de lixo nas margens, ocasionando assim águas sujas e fortes odores (Foto: Cleber Valim Alexandre)

4.2. Análises químicas das amostras de sedimento

As amostras de sedimento de fundo foram coletadas da região marginal do Ribeirão, em duplicata com auxílio de um amostrador manual comum, construído em ácido inoxidável (Fig. 8) e transferidas cuidadosamente para embalagens plásticas com tampa, com 0,5 L de capacidade. As amostras foram mantidas em caixas de isopor, com gelo, para transporte até o laboratório. Uma das repetições foi empregada para a determinação dos potenciais de óxido-redução (Eh) e potencial hidrogeniônico (pH), sendo a outra, congelada até início dos ensaios de toxicidade. Em ambas as campanhas de coleta, foram tomadas medidas de variáveis físico-químicas da água (temperatura, oxigênio dissolvido e condutividade elétrica) de cada ponto de coleta, utilizando-se um medidor Horiba, modelo U-20XD.

As determinações de Eh e pH foram efetuadas diretamente nas camadas subsuperficiais dos sedimentos, sendo conduzidas com auxílio de eletrodos da marca Radiometer, modelos MC3051PT-9 e pHC2051-8, respectivamente. Ambos os eletrodos foram utilizados alternativamente em um mesmo pHmetro Radiometer, modelo PHM210, através de leituras diretas. Essas variáveis foram empregadas para a construção do diagrama de estabilidade do arsênio (BROOKINS, 1988). Após essas aferições, as amostras foram preparadas para as determinações químicas de As total, As^{3+} e As^{5+} .



Figura 8. Coletor de sedimento utilizado nas coletas (Foto: Cleber Valim Alexandre)

Estas amostras de sedimento foram secas em bandejas plásticas à temperatura ambiente e destorroadas em almofariz. O peneiramento das mesmas foi conduzido sequencialmente em peneiras de malha de 1 mm e de 63 μm de porosidades. Alíquotas do peneirado foram submetidas às extrações da fração biodisponível de As em meio de 1 mol L⁻¹ HCl (MOZETO, 2001) e também quanto aos teores de As total, obtido pelo ataque da amostra com água régia. As frações inorgânicas de As³⁺ e As⁵⁺ foram obtidas com e sem redução de solução de iodeto de potássio/ácido ascórbico para consequente determinação do elemento em reação com a solução de borohidreto de sódio, através da técnica de espectrometria de fluorescência atômica (AFS) (CLESCERL et al., 2005), em espectrômetro marca PSA analytical Ltda., modelo Millennium Excalibur. As concentrações de As⁵⁺ para ambas as extrações (total e biodisponível) foram obtidas pela diferença entre o As total e As³⁺. Para a coleta realizada na estação seca, as amostras de sedimento foram submetidas ao procedimento de ataque da amostra com água régia para obtenção do As total, As³⁺ e As⁵⁺ com e sem redução de solução de iodeto de potássio/ácido ascórbico. Já para a coleta da estação chuvosa, as amostras passaram pelos mesmos procedimentos e também foram submetidas às extrações da fração biodisponível, em meio de 1 mol L⁻¹ HCl. Todas as determinações foram feitas em triplicata e o processo de extração empregado para as amostras foi monitorado através do uso de Material de Referência Certificado WQB-1, produzido pelo National Water Research Institute - NWRI (1994), constituído de sedimento do Lago Ontário, no Canadá.

A especiação química do semi-metal As é de grande importância, pois há diferenças significativas na toxicidade das diferentes formas do elemento, sendo as formas inorgânicas mais tóxicas do que as orgânicas. Por estas razões procurou-se utilizar procedimentos simples, integrados, os quais permitissem levar a conhecer as formas inorgânicas mais comuns do elemento. Assim também, bioensaios de toxicidade aguda foram realizados, conhecendo-se as formas químicas do As, e o diagrama de estabilidade pH x Eh do elemento construído, sendo mais uma referência do provável estado de oxidação do As esperado para as amostras coletadas.

4.3. Cultivo dos organismos utilizados nos testes de toxicidade

4.3.1. Cultivo monoxênico do protozoário ciliado *Paramecium caudatum*

Os protozoários ciliados são numerosos em ambientes aquáticos e em todos os tipos de sistemas de tratamento biológico (MADONI et al., 1993, 1996; AMANN et al., 1998), pois exercem um importante papel na purificação e no equilíbrio da comunidade aquática, além de melhorar a qualidade dos efluentes em estações de tratamento de esgoto pela remoção da maioria das bactérias dispersas (CURDS et al., 1968; MADONI et al., 1994; SALVADO´ et al., 1995; MADONI, 2002, 2003).

O ciliado *Paramecium caudatum* utilizado no presente estudo é um dos protozoários mais conhecidos, sendo normalmente encontrado no hipólímio, nas camadas superficiais do sedimento, ou pode estar associado às raízes de macrófitas (Fig. 9). Ele foi escolhido por ser cosmopolita, de fácil manutenção em cultura, ter alta tolerância a grandes concentrações de matéria orgânica e ser capaz de viver no sedimento.

Para seu cultivo foram utilizados 10 mL de uma suspensão da bactéria *Enterobacter aerogenes* em água Minalba[®] estéril (composição química em mg L⁻¹: bário - 0,020; estrôncio - 0,021; cálcio - 16,88; magnésio - 8,76; potássio - 1,18; sódio - 0,87; cloreto - 0,22; bicarbonato - 98,78; sulfato - 0,20; fluoreto - 0,05 e nitrato - 0,20), na concentração de 10⁶ organismos mL⁻¹, em tubos de ensaio contendo ágar não nutriente inclinado e um grão de arroz, com casca, previamente autoclavado (Fig. 10).

Esse meio de cultura é adequado para protozoários bacterívoros, onde o protozoário cultivado se alimenta de *E. aerogenes* que, por sua vez, utiliza o grão de arroz. Para a manutenção das linhagens em cultura, elas foram repicadas pelo menos uma vez ao mês para meios de cultura novos.



Figura 9. Protozoário ciliado *Paramecium caudatum* utilizado nos testes de toxicidade (Fonte: <http://www.moniqueslivefishfoods.co.uk/contents/media/>)

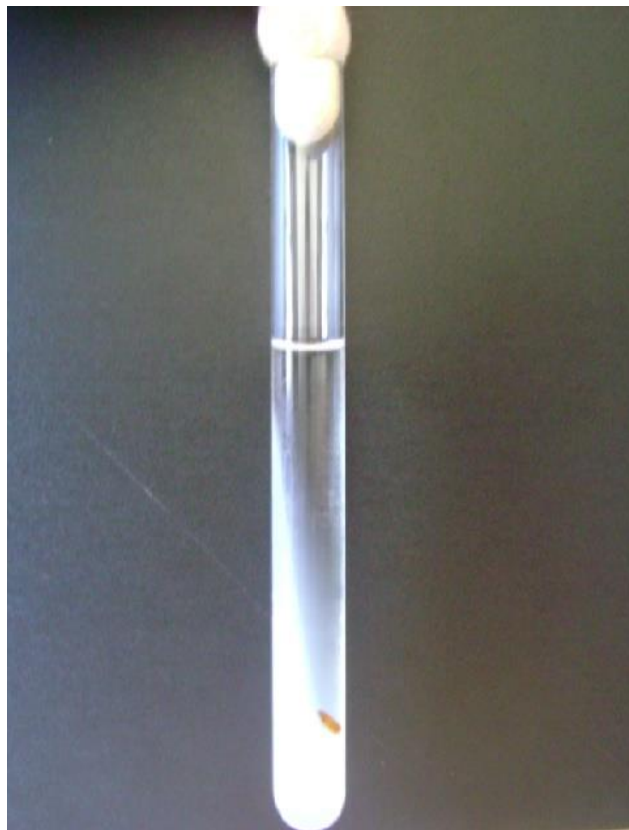


Figura 10. Tubo de ensaio contendo ágar não nutriente inclinado e um grão de arroz com casca, utilizado como meio de cultura para protozoários bacterívoros (Foto: Henrique Cezar Alves)

4.3.2. Meio de cultura padrão para cladóceros

Os Cladocera constituem um dos mais representativos componentes do plâncton de água doce, onde são importantes nas redes tróficas, principalmente de hábito herbívoro filtrador, desempenhando o papel de consumidores primários.

Ceriodaphnia silvestrii Daday, 1902 é uma espécie nativa, comum em ecossistemas de água doce do Brasil (Fig. 11). Ela foi escolhida por ser bem adaptada às condições de laboratório e por apresentar uma alta sensibilidade a produtos químicos, além de exercer um papel fundamental na comunidade aquática, a de servir como proteína animal de alto valor nutricional para peixes.

Os cultivos de *C. silvestrii* foram mantidos em incubadoras com temperatura de 25 ± 2 °C, e fotoperíodo controlado de 12 h (claro)/12 h (escuro) (Fig. 12). Para o cultivo de *C. silvestrii* foi utilizada água reconstituída com as seguintes características: pH 7,0 a 7,6 e dureza entre 40 e 48 mg CaCO₃ L⁻¹, seguindo as normas padronizadas da ABNT (2004; 2005). Esta água constituiu-se de água processada, ajustada para pH e dureza requeridos pelo organismo-teste, utilizada para cultivo e diluição. Os microcrustáceos foram alimentados com suspensão algal de *Pseudokirchneriella subcapitata*, na concentração de 1×10^5 células mL⁻¹ e alimento composto (levedura e ração de peixe fermentada na proporção de 1:1) em uma concentração de 1 mL L⁻¹.



Figura 11. Cladócero *Ceriodaphnia silvestrii* utilizado nos testes de toxicidade
(Fonte: http://species.wikimedia.org/wiki/Ceriodaphnia_silvestrii)



Figura 12. Incubadora com temperatura e fotoperíodo controlados contendo os cultivos de *C. silvestrii* em béqueres de 2 L

4.4. Testes de sensibilidade (controle positivo) dos organismos utilizados nos bioensaios

O controle das condições fisiológicas dos lotes de organismos utilizados nos testes ecotoxicológicos foi realizado anteriormente a estes por meio de testes de sensibilidade (controle positivo) a uma substância de referência, sendo no estudo o NaCl p.a. Para ambas as espécies, seguiu-se a mesma metodologia utilizada nos testes de toxicidade aguda, utilizando solução de NaCl em diferentes concentrações: 0,0 (controle negativo); 1,0; 2,0; 3,0; 3,5 e 4,0 g L⁻¹ para o protozoário e 0,0 (controle negativo); 0,6; 1,0; 1,3; 1,6 e 2,2 g L⁻¹ para o cladóceros. Estas foram definidas de acordo com a CENO(I) = maior concentração nominal do agente tóxico que não causa efeito deletério estatisticamente significativo na sobrevivência dos organismos, nas condições de teste e a CEO(I) = menor concentração nominal do agente tóxico que causa efeito deletério estatisticamente significativo na sobrevivência dos organismos, nas condições de teste (ABNT, 2004; 2005). As concentrações foram preparadas a partir de uma solução estoque (10 g L⁻¹ NaCl), utilizando-se a água de cultivo dos respectivos organismos como água de diluição. Após o período de exposição de cada organismo, registrou-se o número de organismos imóveis ou mortos, através da observação sob lupa, para cálculo da CL₅₀; 24 h, concentração nominal que produz mortalidade em 50% da população do protozoário comparado com os controles e CE(I)₅₀; 48 h, concentração efetiva inicial mediana que causa efeito agudo (imobilidade ou mortalidade) a 50% da população do cladóceros no tempo de exposição, nas condições do teste. Os protozoários foram considerados adequados para serem utilizados nos testes ecotoxicológicos quando o valor da CL₅₀; 24 h estava dentro da faixa de sensibilidade determinada nos testes preliminares realizados e, no caso dos cladóceros, quando o valor da CE(I)₅₀; 48 h estava dentro da faixa de sensibilidade estabelecida, segundo testes realizados ao longo dos anos no Laboratório de Ecotoxicologia da UFSCar, em São Carlos.

Como parte integrante do protocolo foi realizado o controle negativo em todos os testes, utilizando-se apenas água de cultivo dos organismos, que visa confirmar que o método, os materiais e as soluções empregadas não continham materiais tóxicos que poderiam interferir na análise das amostras.

Os controles negativos não foram considerados válidos e os testes foram repetidos quando a porcentagem de organismos imóveis ou mortos excedeu 10% nos controles.

4.5. Bioensaios - efeitos do arsênio e das amostras de sedimento nas respostas biológicas do protozoário e do cladóceros

4.5.1. Bioensaios para verificar a toxicidade das amostras de sedimento

Para os testes com sedimento, as amostras provenientes dos 9 pontos de coleta nas duas amostragens realizadas nas estações de seca e cheia foram descongeladas à temperatura ambiente, sendo pesadas e distribuídas em recipientes, mantendo-se a proporção de 4:1 (peso) de água de cultivo dos organismos e sedimentos, respectivamente (USEPA, 1994). Após sedimentação por 24 horas, retirou-se o líquido sobrenadante (Fig. 13). Essa solução foi utilizada a 100% para exposição dos organismos-teste.

Tanto para o sobrenadante empregado nos testes de toxicidade do sedimento, quanto para o controle negativo (somente água de cultivo dos organismos), foram determinados o pH (pHmetro Quimis, modelo Q400A), a condutividade elétrica (condutivímetro Digimed, modelo DM3) e a dureza (titulometria com EDTA), no início e no final dos testes. Para o protozoário, apenas foi determinado o pH do sobrenadante, devido ao pequeno volume utilizado para os testes.

Os resultados foram expressos através da porcentagem de organismos mortos resultantes, após 24 h (protozoários), e de organismos imóveis ou mortos resultantes, após 48 h (cladóceros), sendo empregado para análise estatística o teste de Fisher do programa TOXSTAT 3.3 (GULLEY et al., 1991).

Considerando que foram utilizadas amostras sem diluição, os resultados dos testes foram expressos de forma qualitativa, ou seja, como “tóxico” ou “não tóxico”, confirmados por meio de análise estatística (teste de Fisher) (ABNT, 2004).



Figura 13. Béquer contendo a amostra de sedimento em processo de sedimentação, na proporção de 4:1 (peso) de água de cultivo dos organismos e sedimentos, respectivamente

Com o sobrenadante das amostras de sedimento, determinaram-se as concentrações de As total deste líquido através da técnica de espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite (Tópico 4.6. abaixo).

4.5.2. Bioensaios com o protozoário *Paramecium caudatum* para verificar a toxicidade aguda do arsênio

Os experimentos com *P. caudatum* foram modificados a partir da metodologia descrita por Madoni e Romeo (2006) e foram realizados em microplacas de cultivo de poliestireno estéreis com 24 poços, modelo 3524, marca Costar (Fig. 14), sob temperatura de 30 °C, pH 8,0 e no escuro, definidos em experimentos de otimização de cultivo (MIRANDA et al., 2008). Os experimentos tiveram duração de 2 e 24 horas, sendo o último com leituras de 2 em 2 horas pelo tempo de geração desta espécie ser de aproximadamente 5,3 horas (MIRANDA et al., 2008). Em cada perfuração foi avaliado um tratamento (controle negativo e diferentes concentrações de As), sendo feitas 4 réplicas. As soluções estoque de As^{3+} e As^{5+} foram preparadas

na concentração de 1.000 mg L^{-1} e volume final de 250 mL cada, sendo estas utilizadas nas diluições com água destilada para o preparo das soluções trabalho e, a partir destas, foram diluídas com água Minalba[®] estéril no preparo das concentrações de As utilizadas nos experimentos. Esta água mineral também foi utilizada na realização do controle negativo. No preparo da solução de As^{3+} , utilizou-se o sal Na_3AsO_3 (0,43 g), além de solução KI/aa nas porcentagens 2% (v/v) - 50% iodeto de potássio + 10% ácido ascórbico (5,0 mL) em meio de solução 5% (v/v) HCl, completando-se, ao final, com água ultra pura Milli-Q[®] (Millipore, Bedford, MA, EUA). No preparo da solução de As^{5+} , utilizou-se o sal Na_3AsO_4 (1,04 g) em meio de solução 5% (v/v) HCl, completando-se o volume com água Milli-Q[®]. Em cada poço foi adicionado 1 mL da solução a ser avaliada, juntamente com 10 protozoários originados de uma pré-cultura em fase logarítmica de crescimento (72 horas), incubada nas condições ótimas pré-definidas no experimento realizado por Miranda et al. (2008). As concentrações de As^{3+} testadas foram 0,0 (controle negativo); 0,6; 0,65; 0,7; 0,75 e 0,8 mg L^{-1} e as de As^{5+} foram 0,0 (controle negativo); 2,0; 2,25; 2,5; 2,75 e 3,0 mg L^{-1} , estabelecidas após a realização de testes preliminares, definidos de acordo com a ABNT (2004; 2005), na qual se considera a CENO(I) = maior concentração nominal do agente tóxico que não causa efeito deletério estatisticamente significativo na sobrevivência dos protozoários, nas condições de teste e a CEO(I) = menor concentração nominal do agente tóxico que causa efeito deletério estatisticamente significativo na sobrevivência dos protozoários, nas condições de teste, comparado com os controles. Os protozoários não foram alimentados durante a execução dos experimentos. No início e no final do teste foram realizadas apenas medidas de pH, devido ao menor volume utilizado nos ensaios.

Realizou-se 2 análises independentes, uma determinando a concentração média letal em 2 h de exposição (2 h CL_{50} = concentração nominal que produz mortalidade em 50% da população do protozoário comparado com os controles), repetida 10 vezes e outra, com duração de 24 h, com leituras em intervalos de 2 h, sendo cada tratamento checado em lupa quanto à mortalidade, divisão ou sobrevivência dos protozoários. Com esses experimentos foi possível prever valores da CL_{50} em uma ampla faixa de concentrações de As em vários tempos de exposição.



Figura 14. Microplaca de cultivo com 24 poços, destinada aos testes de toxicidade com o protozoário *P. caudatum*

4.5.3. Bioensaios com o cladócero *Ceriodaphnia silvestrii* para verificar a toxicidade aguda do arsênio

Os procedimentos metodológicos foram realizados de acordo com Norma Técnica padronizada (ABNT, 2004; 2005). Os experimentos de toxicidade aguda consistiram na exposição de 5 neonatas com menos de 24 horas de idade por réplica, a diferentes concentrações de As^{3+} : 0,0 (controle negativo); 10^{-6} ; 10^{-5} ; 10^{-4} ; 10^{-3} ; 10^{-2} e 10^{-1} mg L⁻¹, e As^{5+} : 0,0 (controle negativo); 5×10^{-3} ; 10^{-2} ; 5×10^{-2} ; 10^{-1} ; 5×10^{-1} e 1,0 mg L⁻¹, estabelecidas após a realização de testes preliminares, definidos de acordo com a CENO(I) e a CEO(I). Os organismos-teste provenientes do cultivo foram capturados, com o auxílio de uma micropipeta de Pasteur de ponta arredondada com 2 mm de diâmetro. O teste de toxicidade foi realizado em recipientes plásticos de poliestireno atóxicos contendo 10 mL de solução teste, que receberam as amostras com diferentes concentrações a serem testadas juntamente com 5 neonatas (Fig. 15). Para cada concentração de As^{3+} e As^{5+} foram estabelecidas cinco réplicas e um controle negativo, realizado com a água de cultivo, no caso a reconstituída, ajustada para pH e dureza requeridos pelo organismo-teste. As soluções estoque e de trabalho de As^{3+} e As^{5+} utilizadas nos experimentos

foram as mesmas preparadas nos ensaios com protozoários, descritas no item anterior. Os experimentos foram mantidos sob a mesma temperatura dos cultivos-estoque, sem iluminação e alimentação (Fig. 16). No início e no final dos testes foram realizadas medidas das variáveis pH, condutividade elétrica e dureza. Após o período de exposição de 48 h, procedeu-se à contagem dos organismos imóveis sob lupa, e os resultados foram expressos como porcentagem de organismos imóveis para o cálculo da concentração efetiva inicial mediana CE(I) da substância tóxica, que causa efeito a 50% da população de cladócero exposta (HAMILTON et al., 1977). Os dados foram comparados com o controle utilizando-se o programa estatístico Trimmed Spearman-Kärber.



Figura 15. Recipientes plásticos de poliestireno atóxicos contendo 10 mL de solução teste, utilizados nos testes de toxicidade aguda com o cladócero *C. silvestrii*



Figura 16. Incubadora utilizada para o experimento de toxicidade aguda com o cladóceros *C. silvestrii*

4.6. Determinação da concentração de As total nos protozoários e cladóceros

Arsênio total dissolvido inclui todas as espécies de As presentes em uma amostra. Neste trabalho, as determinações de As total dissolvido na água de cultivo no início e final dos experimentos, e no sobrenadante das amostras de sedimento foram realizadas em espectrômetro de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite (Varian, GTA 100 SpectrAA - 800), equipado com corretor Zeeman transversal e aquecimento longitudinal (Fig. 17).

Todas as soluções foram preparadas empregando-se reagentes de alta pureza analítica e água ultra pura Milli-Q[®] (Millipore, Bedford, MA, EUA).

Para a determinação do As total nos organismos (As total particulado) foram realizados experimentos modificados a partir da metodologia descrita por Nogueira (2007). Ao final dos experimentos de toxicidade, os organismos

sobreviventes e, no caso, os mortos da maior concentração utilizada foram transferidos para membranas de policarbonato de 25 mm de diâmetro e 0,8 µm de diâmetro de poro (Whatman) previamente numeradas e pesadas em balança analítica OHAUS, modelo AS200 (Ohaus Corporation, Florham Park, NJ, EUA). Posteriormente, as membranas contendo os organismos foram colocadas em estufa a uma temperatura de 60 °C por 48 h (Fig. 18). Após este procedimento, essas membranas foram pesadas novamente para estimativa de peso seco (dw) e transferidas para frascos de policarbonato, onde foi feita a digestão ácida, adicionando-se 2 mL de HNO₃ 4 mol L⁻¹ e 1 mL de H₂O₂ em cada amostra. As amostras contendo os organismos, HNO₃ e H₂O₂ foram transferidas para uma estufa a 90 °C (Fig. 19), onde permaneceram por 48 h (LORES et al., 1999). Após digestão ácida, o volume da amostra foi completado para 5 mL com água Milli-Q[®] em uma concentração final de 1,6 mol L⁻¹, para posterior determinação em espectrômetro de absorção atômica com forno de grafite.

Para obtenção do As adsorvido na superfície celular, realizou-se um experimento com os organismos vivos e mortos retidos da penúltima concentração utilizada nos testes. Estes foram ressuspensos em 2 mL de solução quelante, constituída de EDTA (ácido etilenodiaminotetraacético), em concentração de 1 x 10⁻² mol L⁻¹ e pH 7,0 por 30 s (MIRIMANOFF & WILKINSON, 2000). Posteriormente, o volume foi ajustado com água Milli-Q[®] para 5 mL, onde a concentração final de EDTA foi de 4 x 10⁻³ mol L⁻¹. A amostra foi transferida para membranas de policarbonato de 25 mm de diâmetro e 0,8 µm de diâmetro de poro (Whatman) com o auxílio de capilares e micropipetas de Pasteur, sendo estas membranas previamente lavadas em banho com solução 10% v/v de HNO₃. A membrana contendo os organismos foi usada para determinação de As intracelular e submetida à digestão ácida, adicionando-se sobre os mesmos 2 mL de HNO₃ 4 mol L⁻¹ e 1 mL de H₂O₂ e, posteriormente, transferidos para uma estufa a 90 °C, onde permaneceram por 48 h. Após a digestão, o volume da amostra foi ajustado para 5 mL com água Milli-Q[®]. As concentrações de As total dissolvido e As intracelular foram determinadas através de espectrômetro de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS), utilizando-se um equipamento Varian, GTA 100 SpectrAA - 800.

Para efeito de avaliação do procedimento empregado no preparo da amostra, foi realizado o controle negativo em todos os testes, utilizando apenas água de cultivo dos organismos, que visa confirmar que o método, os materiais e as soluções empregadas não continham materiais tóxicos que poderiam interferir na análise e quantificação de As nas amostras.



Figura 17. Espectrômetro de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS) utilizado na determinação das concentrações de As total na água de cultivo, no sobrenadante do sedimento e nos organismos-teste



Figura 18. Estufa a 60 °C por 48 h para secagem das membranas contendo os organismos



Figura 19. Estufa a 90 °C por 48 h para digestão ácida dos organismos em frascos de policarbonato

4.6.1. Determinação da concentração de As total no protozoário *Paramecium caudatum*

A água de cultivo-estoque (50 mL) contendo os ciliados *P. caudatum* foi filtrada com auxílio de rede de 10 µm de abertura de malha e os organismos retidos foram ressuspensos em água Minalba® estéril. Uma alíquota de 1 mL desta água foi retirada e fixada com 1 mL de lugol ácido para contagem dos organismos (LORES et al., 1999). No caso da impossibilidade de se estimar o peso seco, trabalha-se com número de indivíduos (pg x indivíduo As); por isso a importância da contagem dos protozoários antes e após o período de exposição. Um inóculo de 2 mL da água ressuspensa de *P. caudatum* foi adicionado à cada tratamento, sendo realizadas três réplicas de 5 mL cada, além do controle negativo, realizados em microplacas de cultivo. Após 24 h, 1 mL foi novamente retirado para contagem dos organismos vivos e parte da cultura (10 mL de cada tratamento) foi filtrada em membranas de policarbonato, sendo os protozoários retidos por meio de capilares. O filtrado foi separado

para determinação da concentração final de As dissolvido do experimento, enquanto a membrana contendo os ciliados foi preparada para análise de As total particulado.

4.6.2. Determinação da concentração de As total no cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii*

Os cladóceros *C. silvestrii* provenientes do cultivo (2 L cada cultivo-estoque) foram capturados, com o auxílio de uma micropipeta de Pasteur de ponta arredondada com 2 mm de diâmetro, e os organismos foram ressuspensos em água reconstituída, descrita anteriormente. O teste de toxicidade foi realizado em recipientes plásticos de poliestireno atóxicos contendo 50 mL de solução teste, que receberam as amostras com diferentes concentrações a serem testadas juntamente com os cladóceros de cada cultivo-estoque, sendo realizadas três réplicas, além do controle negativo. Após 48 h, os organismos foram capturados em membranas de policarbonato, previamente pesadas para contagem de indivíduos e estimativa de peso seco ($\mu\text{g} \times \text{g}^{-1} \text{ dw As}$). O filtrado foi separado para determinação da concentração final de As dissolvido do experimento, enquanto a membrana contendo os cladóceros foi preparada para análise de As total particulado.

4.6.3. Determinação dos teores totais de arsênio na água de cultivo, no sobrenadante do sedimento e nos organismos-teste

A espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS) foi empregada para a determinação dos teores totais de As na água de cultivo no início e final dos experimentos, no sobrenadante das amostras de sedimento e nos organismos-teste, de acordo com o realizado por Dionísio (2009). Para isso, utilizou-se uma solução de 1.000 mg L^{-1} de paládio (Pd) como modificador químico, com a introdução de $5 \mu\text{L}$ de modificador. A Tabela 2 mostra as condições operacionais adotadas. O programa de aquecimento foi estabelecido utilizando uma solução contendo $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de As, em meio de 0,1% v/v HNO_3 . O programa estabelecido está apresentado na Tabela 3.

Tabela 2. Condições operacionais do espectrômetro de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS) (Fonte: DIONÍSIO, 2009)

Corrente da lâmpada	10 mA
Resolução espectral	0,2 nm
Comprimento de onda	193,7 nm
Modificador químico	Pd
Volume de amostra	25 µL
Volume de modificador	5 µL

Tabela 3. Programa de aquecimento do espectrômetro de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS) para a determinação de As (Fonte: DIONÍSIO, 2009)

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (s) (rampa, patamar)	Vazão do gás (L min⁻¹)
Secagem	90	5, 40	3,0
Secagem	120	10, 5	3,0
Pirólise	700	5, 2	3,0
Atomização	2.300	1, 2	0,0
Limpeza	2.800	2, 1	3,0

No trabalho de Dionísio (2009), para o estabelecimento das máximas temperaturas de pirólise e atomização, as curvas foram obtidas experimentalmente em meio de HNO₃ na presença do modificador químico Pd com concentração de 1.000 mg L⁻¹. A opção de trabalhar com este modificador está de acordo com estudos realizados por Husakova et al. (2007) para minimizar as interferências espectrais causadas pelos elevados teores de fósforo presentes nas amostras. As curvas foram geradas experimentalmente pela variação gradual de temperatura tanto de pirólise como de atomização, em intervalos de 100 °C, como mostra a Fig. 20.

Como o As se trata de um elemento volátil optou-se por utilizar Pd como modificador químico, que consiste em adicionar uma solução proveniente de um metal ou um sal de metal para reter o analito durante a etapa de pirólise, evitando assim perdas por volatilização.

De acordo com Dionísio (2009), o máximo sinal de absorvância integrada para a etapa de pirólise sem perdas do analito, e usando-se modificador químico ocorreu em uma temperatura de 700 °C. Acima dessa temperatura ocorreu queda no sinal de absorvância, indicando perdas do analito por volatilização. Fixando-se esse valor para a temperatura de pirólise, utilizou-se um estudo desenvolvido por essa mesma autora para estabelecer o sinal máximo na etapa de atomização, que ocorreu em 2.300 °C. Esses resultados estão concordantes com alguns resultados encontrados na literatura, visto que em muitos trabalhos a temperatura de pirólise pode ser encontrada variando de 700 até 1.200 °C. Já a temperatura de atomização pode ser encontrada na faixa de 2.100 até 2.500 °C, sempre considerando o analito estudado e o modificador químico empregado (HUANG et al., 1988; CHAPPELL et al., 1995; LIU et al., 2005; LI et al., 2006; SERAFIMOVSKI et al., 2006; DEVESA et al., 2008).

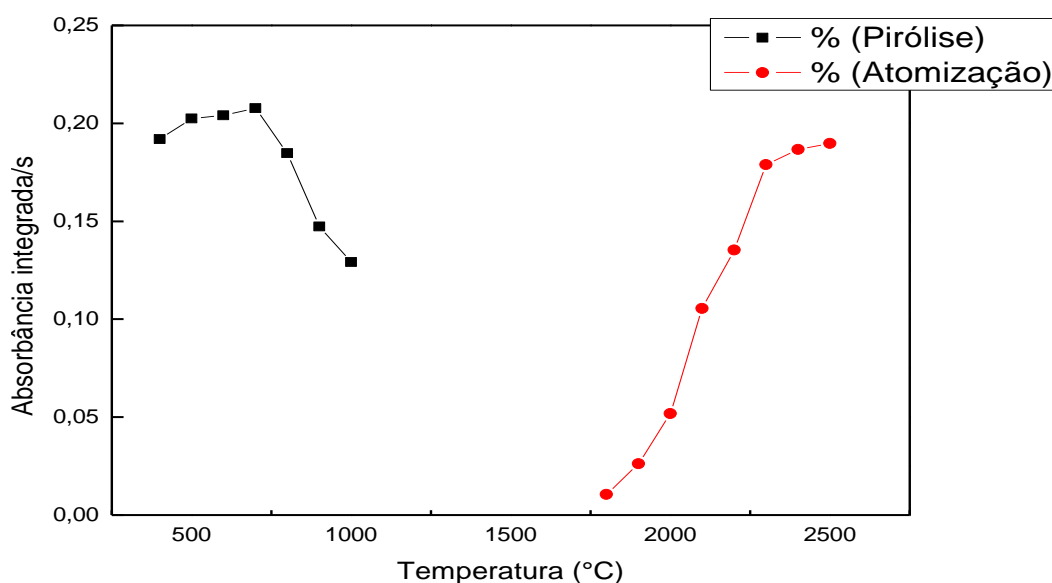


Figura 20. Curvas de temperatura de pirólise e atomização para solução de 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ As, em meio de HNO_3 0,1% v/v e 1.000 mg L^{-1} Pd (Fonte: DIONÍSIO, 2009)

O programa de aquecimento utilizado está indicado na Tabela 3 acima e corresponde ao recomendado pelo manual do equipamento, alterando-se apenas as temperaturas de pirólise e atomização.

A partir do programa de aquecimento estabelecido e dos dados experimentais foi calculada a massa característica para o analito, que é definida como a massa do analito, em picogramas, requerida para produzir um sinal de absorvância igual a $0,0044 \text{ A s}^{-1}$ (absorvância por segundo), realizado por Dionísio (2009). Frequentemente esse parâmetro é empregado para avaliar a condição de operação do instrumento (BEATY & KERBER, 1993). Neste trabalho foi empregado um forno de grafite com aquecimento longitudinal e a massa característica para As encontrada foi de 23 pg, enquanto na literatura, para um forno de grafite com aquecimento longitudinal, a massa característica para As situa-se em torno de 15 pg (O'DAY, 2006). No entanto, para um forno de grafite com aquecimento transversal, a massa característica é de 40 pg (WELZ & SPERLING, 1999). Esses valores de massa característica diferem para cada tipo de forno, devido ao gradiente de temperatura que ocorre no interior do tubo de grafite durante o aquecimento. Como o aquecimento de um forno longitudinal ocorre de uma extremidade para outra, isso acaba implicando em maior gradiente de temperatura e, conseqüentemente, no valor da massa característica para cada elemento.

O limite de detecção (LOD), que é calculado como 3 vezes o valor do desvio padrão do branco analítico dividido pelo coeficiente angular da curva analítica de calibração, e o limite de quantificação (LOQ), que é calculado como 10 vezes o valor do desvio padrão do branco analítico dividido pelo coeficiente angular da curva analítica de calibração foram determinados. Neste caso, o LOD foi de $8,0 \text{ pg x indivíduo As}$ ou $2,0 \text{ } \mu\text{g x g}^{-1} \text{ dw As}$ para os protozoários e $21,1 \text{ pg x indivíduo As}$ ou $6,0 \text{ } \mu\text{g x g}^{-1} \text{ dw As}$ para os cladóceros, e o LOQ foi de $28,0 \text{ pg x indivíduo As}$ ou $8,1 \text{ } \mu\text{g x g}^{-1} \text{ dw As}$ e $70,4 \text{ pg x indivíduo As}$ ou $21,0 \text{ } \mu\text{g x g}^{-1} \text{ dw As}$ respectivamente, sendo que a vida útil média do tubo de grafite foi de 210 ciclos de aquecimento. Para efeito de comparação entre os dois organismos-teste, estimou-se o valor em pg x indivíduo As e $\text{ } \mu\text{g x g}^{-1}$ de peso seco As.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização limnológica dos pontos de coleta

Nas Tabelas 4 e 5 podem ser observados os valores de temperatura, oxigênio dissolvido, potencial hidrogeniônico e condutividade elétrica registrados para a água nos pontos de coleta em 24 de julho de 2008 e 9 de março de 2009. Os valores registrados para as variáveis físicas e químicas foram semelhantes entre os pontos de amostragem para cada coleta, com exceção dos Pontos da Nascente (P0), do Bairro de Tanquinho (P1) e do Disque Animais (P5). Para a coleta realizada na estação seca, o menor valor de temperatura obtido foi 16,4 °C e o maior 22,4 °C. Já para a coleta realizada na estação chuvosa, o menor valor foi 23,5 °C e o maior 32 °C. Essas variações de temperatura entre os pontos no mesmo dia de coleta podem ser atribuídas aos diferentes horários de coleta, além de terem influência da degradação de compostos poluentes devido à alta atividade microbiana, ocasionando o aumento de temperatura. Observa-se que a maior amplitude térmica ocorreu na coleta realizada na estação de cheia.

Os pontos da coleta realizada na estação seca apresentaram valores de oxigênio dissolvido entre 7,18 e 9,55 mg L⁻¹, com exceção do Ponto do Disque Animais (P5), no qual foi registrado 2,37 mg L⁻¹. Na coleta realizada na estação chuvosa, os valores variaram entre 3,17 e 4,7 mg L⁻¹, com exceção do mesmo Ponto 5, no qual registrou-se 1,95 mg L⁻¹. Os baixos valores de oxigênio dissolvido encontrados na estação chuvosa podem ser devido à entrada de grande quantidade de material orgânico alóctone da área de drenagem. De acordo com a Resolução do CONAMA nº 357/2005 para as águas doces de Classe I (Tabela 6), o oxigênio dissolvido em qualquer amostra deve ser superior a 6,00 mg L⁻¹, sendo que no Ponto 5 da coleta da estação seca e em todos os pontos da coleta da estação chuvosa, estes valores estiveram abaixo dos padrões recomendados. Com relação à variável oxigênio dissolvido na água, os valores obtidos ficaram compatíveis aos padrões de águas doces de Classe IV (superior a 2,00 mg L⁻¹), destinadas à navegação e harmonia paisagística.

Os valores de pH na estação seca variaram entre 5,55 no Ponto da Nascente (P0) e 6,63 no Ponto do Matadouro (P8) e na estação chuvosa, os valores variaram de 6,03 a 6,56. A faixa de pH ótimo pela Resolução do CONAMA n° 357/2005 para águas doces seria entre 6,00 a 9,00; estando assim os Pontos da Nascente (P0) e do Disque Animais (P5) da estação seca levemente ácidos (Tabela 6). Já para os padrões de lançamento de efluentes (pH de 5,00 a 9,00), os pHs estão dentro da faixa permissível.

Na estação seca, os valores de condutividade elétrica foram semelhantes nos diferentes pontos, sendo eles entre 124 e 174 $\mu\text{S cm}^{-1}$, com exceção dos Pontos da Nascente (P0) e do Bairro de Tanquinho (P1) com valores de 11 e 67 $\mu\text{S cm}^{-1}$, respectivamente. Este dado seria o esperado, pois na região da nascente e próximo dela a água costuma ser mais pobre em substâncias químicas e, conforme recebe materiais e partículas da bacia de drenagem, a condutividade aumenta. Além disso, nesta região, a água sofreu menos interferências antrópicas, como o enriquecimento por contaminantes oriundos de esgotos, indústria, agricultura e até mesmo da vegetação do entorno. Na estação chuvosa, os valores foram semelhantes entre 96,4 e 159,3 $\mu\text{S cm}^{-1}$, com exceção dos Pontos da Nascente (P0), do Bairro de Tanquinho (P1) e do Disque Animais (P5) com valores de 12,2; 77,4 e 53,9 $\mu\text{S cm}^{-1}$, respectivamente.

Tabela 4. Medições das variáveis dos pontos de coleta do Ribeirão Guamium na estação seca, em 24 de julho de 2008. Não foi possível a coleta do Ponto da Estação de Tratamento de Esgoto (P3)

Hora da coleta	Pontos	Temperatura (°C)	OD (mg L⁻¹)	pH	Condutividade (µS cm⁻¹)
9 h 09 min	Nascente (P0)	19,6	7,18	5,55	11,0
11 h 47 min	Disque Animais (P5)	22,4	2,37	5,89	156,0
12 h 20 min	Condomínio (P6)	17,5	8,48	6,24	138,0
12 h 53 min	Matadouro (P8)	18,2	7,36	6,63	174,0
15 h 19 min	Clube Atlético (P7)	17,6	8,71	6,42	139,0
16 h 19 min	Bairro de Tanquinho (P1)	16,4	9,55	6,03	67,0
16 h 54 min	Usina Capuava (P2)	19,6	7,36	6,25	124,0
17 h 30 min	Fazenda da APTA (P4)	17,6	8,60	6,44	133,0

Tabela 5. Medições das variáveis dos pontos de coleta do Ribeirão Guamium na estação chuvosa, em 9 de março de 2009. Não foi possível a medição do Ponto da Estação de Tratamento de Esgoto (P3)

Hora da coleta	Pontos	Temperatura (°C)	OD (mg L⁻¹)	pH	Condutividade (µS cm⁻¹)
9 h 50 min	Nascente (P0)	28,0	3,56	6,43	12,2
10 h 50 min	Bairro de Tanquinho (P1)	23,5	3,17	6,35	77,4
11 h 32 min	Usina Capuava (P2)	27,9	4,42	6,03	96,4
12 h 18 min	Fazenda da APTA (P4)	26,7	4,70	6,23	111,1
13 h 50 min	Disque Animais (P5)	32,0	1,95	6,09	53,9
14 h 28 min	Condomínio (P6)	27,5	4,13	6,56	127,4
15 h 15 min	Clube Atlético (P7)	27,0	4,21	6,32	126,2
15 h 50 min	Matadouro (P8)	27,0	3,33	6,45	159,3

Tabela 6. Resolução do CONAMA nº 357/2005

Água doce	Classe I	Classe II	Classe III	Classe IV
Clorofila α ($\mu\text{g L}^{-1}$)	até 10	até 30	até 60	-
Coliformes termotolerantes (coliformes L^{-1})	até 200	até 1.000	até 4.000	-
Corantes	ausente	ausente	ausente	-
Cor verdadeira (mg Pt L^{-1})	cor natural	até 75	até 75	-
DBO (mg L^{-1}) 5 dias a 20 °C	até 3	até 5	até 10	-
Densidade de cianobactérias (cél. mL^{-1})	até 20.000	até 50.000	até 100.000	-
Fósforo total em mg L^{-1} (ambiente intermediário)	0,025	0,050	0,075	-
Fósforo total em mg L^{-1} (ambiente lêntico)	0,02	0,03	0,05	-
Fósforo total em mg L^{-1} (ambiente lótico)	0,10	0,10	0,15	-
Gosto ou odor	ausente	ausente	ausente	não objetáveis
Materiais flutuantes	ausente	ausente	ausente	ausente
Nitrato (mg L^{-1})	10	10	10	-
Nitrito (mg L^{-1})	1	1	1	-
Nitrogênio amoniacal total (mg L^{-1})	3,7 ($\text{pH} \leq 7,5$)	3,7	13,3	-
	2,0 ($7,5 < \text{pH} \leq 8,0$)	2,0	5,6	
	1,0 ($8,0 < \text{pH} \leq 8,5$)	1,0	2,2	
	0,5 ($\text{pH} > 8,5$)	0,5	1,0	
Óleos e graxas	ausente	ausente	ausente	toleram-se iridescências
OD (mg L^{-1})	≥ 6	≥ 5	≥ 4	> 2
pH	6,0 a 9,0	6,0 a 9,0	6,0 a 9,0	6,0 a 9,0
Resíduos sólidos objetáveis	ausente	ausente	ausente	-
STD (mg L^{-1})	500	500	500	-
Toxicidade	não verificação de efeito tóxico crônico	não verificação de efeito tóxico crônico	não verificação de efeito tóxico agudo	-
Turbidez (UNT)	até 40	até 100	até 100	-

5.2. Análises químicas das amostras de sedimento

As concentrações de As total, As^{3+} e As^{5+} no sedimento ($mg\ kg^{-1}$) dos pontos amostrados nas duas coletas encontram-se nas Tabelas 7 e 8.

Observa-se que na estação chuvosa, as concentrações de As total foram maiores do que na estação seca, indicando origem alóctone do mesmo. Esta tendência está relacionada à maior mobilidade da forma reduzida, a qual é arrastada do solo pela ação das chuvas (KABATA-PENDIAS & PENDIAS, 2001). Embora não seja possível quantificar e comparar, devido a processos de extrações diferentes empregados na determinação de As^{3+} nas amostras coletadas nas duas estações, verifica-se que as concentrações de As^{5+} seriam também maiores para as amostras coletadas nos Pontos do Condomínio (P6), do Clube Atlético (P7) e do Matadouro (P8) na estação chuvosa.

Através dos baixos valores obtidos de condutividade nos pontos situados à montante (0 e 1) na bacia (Tabelas 4 e 5 acima), supõe-se que os altos valores observados de As em sedimentos possam ser de origem geológica e não apenas oriundo do transporte de material alóctone, sobretudo por tratar-se de área protegida ou APP.

Na estação seca, as maiores frações de As inorgânico corresponderam à sua forma As^{5+} e na chuvosa corresponderam ao As^{3+} biodisponível (Tabelas 7 e 8). As menores concentrações de As total foram observadas no Ponto da Estação de Tratamento de Esgoto (P3) para a estação de cheia, e à jusante no Ponto do Clube Atlético (P7) para a estação de seca. Este fato pode ser explicado pela contaminação difusa, devido ao uso de herbicidas que possuem As como princípio ativo (CH_4AsO_3Na) nas plantações de cana-de-açúcar, manifestando-se de maneira aleatória ao longo da microbacia (Fig. 21).

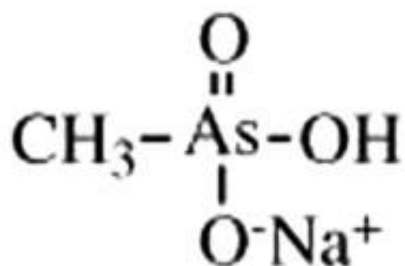


Figura 21. Fórmula química do metano arsenato ácido monossódico ($\text{CH}_4\text{AsO}_3\text{Na}$), popularmente conhecido como herbicida Volcane (Fonte: http://www.chem10.com/Article/cp/200912/Article_17604.html)

Tabela 7. Concentrações de As total, As^{3+} e As^{5+} (mg kg^{-1}) nas amostras de sedimento do Ribeirão Guamium, Piracicaba, São Paulo na estação seca, em 24 de julho de 2008. Os pontos não amostrados não foram coletados ou as análises apresentaram repetições não confiáveis que foram descartadas

Pontos	Estação seca		
	As total	As^{3+}	As^{5+}
Bairro de Tanquinho (P1)	30,46	11,40	19,06
Disque Animais (P5)	4,33	1,60	2,73
Condomínio (P6)	1,90	1,60	0,30
Clube Atlético (P7)	1,72	1,60	0,12
Matadouro (P8)	1,84	1,50	0,34

Tabela 8. Concentrações de As total, As³⁺ e As⁵⁺ (mg kg⁻¹) no extrato 1 mol L⁻¹ HCl em amostras de sedimento coletadas na estação chuvosa, em 9 de março de 2009. A análise do Ponto do Disque Animais (P5) apresentou repetições não confiáveis que foram descartadas

Pontos	Estação chuvosa		
	Teores totais	Teores disponíveis (sem redução com KI/aa)	Material residual
	As total	As ³⁺	As ⁵⁺
Nascente (P0)	9,8	6,2	3,6
Bairro de Tanquinho (P1)	36,7	21,5	15,2
Usina Capuava (P2)	3,7	2,2	1,5
Estação de Tratamento de Esgoto (P3)	1,5	0,8	0,7
Fazenda da APTA (P4)	6,5	4,0	2,5
Condomínio (P6)	6,5	3,5	3,0
Clube Atlético (P7)	2,7	1,6	1,1
Matadouro (P8)	2,7	1,6	1,1

Segundo a Cetesb (2005), os níveis de As total em sedimentos de ambientes contaminados estão entre 3,5 e 15 mg kg⁻¹ e os pontos analisados no presente trabalho apresentaram concentrações de As acima desta categoria. Para o Ponto do Bairro de Tanquinho (P1) na estação seca, obteve-se 30,46 mg kg⁻¹ As total no sedimento e para a estação chuvosa 36,7 mg kg⁻¹ As total. Para Kabata-Pendias e Pendias (2001), concentrações de As total acima de 20 mg kg⁻¹ são indicativas para intervenção na área incidente. Em

condições brasileiras, mais especificamente preconizadas para o Estado de São Paulo, esta conduta somente deve ser utilizada para concentrações de As total igual à 35 mg kg^{-1} (CETESB, 2005) para solos agrícolas.

Siqueira et al. (2004), observaram uma acumulação significativa de As nos sedimentos de fundo coletados no Sistema Estuarino de Santos, variando de 12 a 27 mg kg^{-1} As total, evidenciando influência de efluentes industriais contaminados. Os níveis foram maiores que os do Ribeirão Guamium, com exceção do Ponto do Bairro de Tanquinho (P1).

Nos trabalhos seguintes verificados em outros rios, os níveis de As total no sedimento foram excessivamente altos comparados aos do Ribeirão Guamium, visto serem áreas de intensa contaminação antrópica, principalmente; no entanto, este já se encontra em processo de degradação. Não foram encontrados trabalhos na literatura evidenciando a especiação química do As em amostras de sedimento, demonstrando, assim, a importância do presente trabalho e das dificuldades envolvidas, inclusive comparativas.

Estudos da qualidade do sedimento do Rio Ribeira e tributários na região do Médio Vale, na região de São Paulo e do Paraná, indicaram teores de até 345 mg kg^{-1} As total em sedimento de corrente, resultantes do intenso intemperismo químico que afetou rochas e mineralizações arseníferas (TOUJAGUE, 1999).

No Amapá, o As ocorre em arsenopirita associada às formações manganíferas de idade pré-cambriana, lavradas por mais de 50 anos na famosa mina de Serra do Navio. A fonte de As em arsenopirita associada ao manganês não se localiza na mina, mas no município de Santana, 350 km distante, às margens do Rio Amazonas, onde o minério de manganês era processado e embarcado. Amostras de sedimento fluvial e material em suspensão apresentaram teores variando de 1.600 a 696 mg kg^{-1} As total (LIMA, 2003).

Nos sedimentos superficiais do Quadrilátero Ferrífero, na região de Ouro Preto, Borba et al. (2003a) constataram que os maiores teores de As estão localizados nas proximidades das mineralizações auríferas, onde as concentrações podem alcançar até 4.500 mg kg^{-1} As total, devido à oxidação natural das rochas e, principalmente da atividade antrópica, que se deu por meio do lançamento dos rejeitos da mineração nas drenagens. Segundo

estimativas de Borba et al. (2000), a atividade antrópica provocou o lançamento nos rios do Quadrilátero de, pelo menos, 390.000 toneladas de As durante 300 anos de mineração.

Através das concentrações de As obtidas do sedimento do Ribeirão Guamium na estação chuvosa (Tabela 8 acima), observa-se que uma significativa fração do As total encontra-se na forma biodisponível, com prevalência da forma reduzida, como As^{3+} . Para estas amostras coletadas em 9 de março de 2009, as prováveis formas de As encontram-se plotadas no diagrama de estabilidade pH x Eh, onde foram inseridos os valores de pH das leituras diretas do pHmetro; e de Eh, acrescidos da constante 244 mV para compensar o potencial do eletrodo de hidrogênio (Fig. 22, Tabela 9). Verifica-se que, à exceção do Ponto da Nascente (P0), todos os demais pontos encontram-se delimitados em formas químicas com o As no estado de oxidação +5. Este diagrama foi elaborado considerando-se a estabilidade do mineral escorodita, devido às inter-relações existentes entre o As e o Fe (DOVE & RIMSTIDT, 1985). Pode-se observar também a importância do S no comportamento do As e que o As nascente, de ocorrência rara na natureza, seria verificado em condições de elevada alcalinidade do meio, o que não se constata nos valores de pH dos sedimentos da bacia do Ribeirão Guamium. No diagrama, em uma ampla faixa de valores de Eh e pH, destacam-se o ácido arsênico e seus produtos de ionização no controle do comportamento do As no ambiente (BROOKINS, 1988).

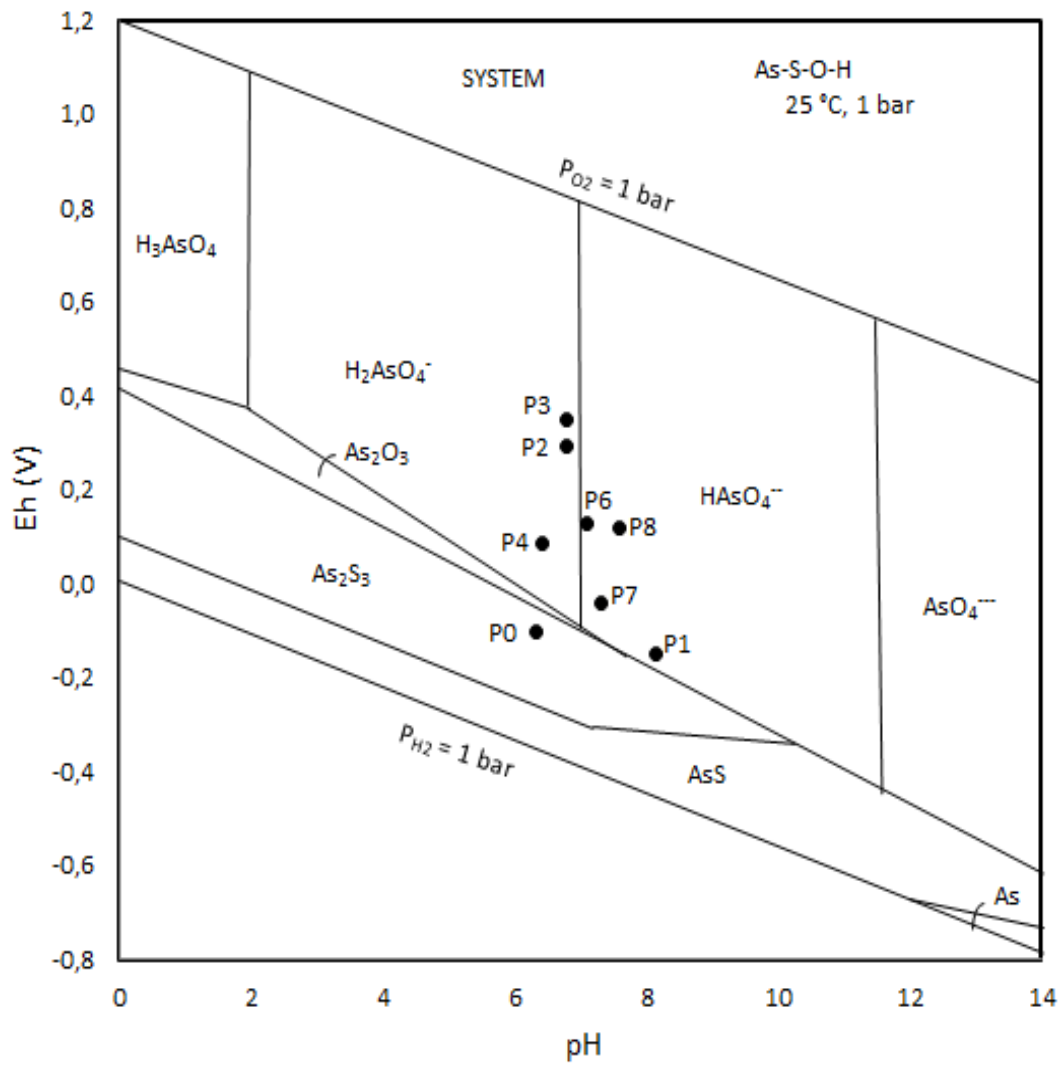


Figura 22. Diagrama de estabilidade termodinâmica para o As, contendo pH no eixo das abscissas e potencial de óxido-redução, Eh (V), no eixo das ordenadas (Fonte: BROOKINS, 1988)

Tabela 9. Índice pH x Eh do sedimento de fundo do Ribeirão Guamium na estação chuvosa, em 9 de março de 2009. A análise do Ponto do Disque Animais (P5) apresentou repetições não confiáveis que foram descartadas. pH = potencial hidrogeniônico; Eh = potencial de óxido-redução

Pontos	pH	Eh (V)
Nascente (P0)	6,33	-0,102
Bairro de Tanquinho (P1)	8,14	-0,150
Usina Capuava (P2)	6,81	0,294
Estação de Tratamento de Esgoto (P3)	6,79	0,349
Fazenda da APTA (P4)	6,43	0,087
Condomínio (P6)	7,11	0,128
Clube Atlético (P7)	7,33	-0,039
Matadouro (P8)	7,61	0,118

De maneira geral, a previsão esperada para as formas oxidadas de As pelo diagrama de estabilidade termodinâmica (Fig. 22) não foram condizentes com os valores obtidos pelos métodos químicos de análise, ora empregando-se a etapa de redução das formas de As com a mistura redutora de iodeto de potássio/ácido ascórbico, ora não se efetuando este processo. Para as amostras relativas à estação seca, a concordância foi verificada nos Pontos do Bairro de Tanquinho (P1) e do Disque Animais (P5) (Tabela 7 acima). Para as amostras referentes à estação chuvosa, observa-se que, mesmo em se tratando de extração branda ($1 \text{ mol L}^{-1} \text{ HCl}$), a forma predominante do As ocorreu no estado de oxidação +3 (Tabela 8 acima). O poder redutor do HCl provavelmente contribuiu para este resultado, mas o que deve ser mencionado é que, a fração biodisponível do As (MOZETO, 2001) representa altas porcentagens do As total, o que corrobora com os índices de toxicidade observados nos bioensaios conduzidos com os sedimentos neste trabalho (Tópico 5.4. abaixo).

Com as dificuldades envolvidas na análise de especiação de um elemento e pelo As existir na natureza em uma variedade de formas químicas, verificou-se que não basta apenas utilizar um método de separação das espécies de As, onde os procedimentos usuais empregam ou a cromatografia líquida de alta eficiência - HPLC (CHEN & BELZILE, 2010) ou a eletroforese capilar (LEERMAKERS, 2006), pois nem estes podem garantir a estabilidade das diferentes espécies químicas, sendo esses valores dependentes de todas as etapas analíticas, a começar pela coleta. Mesmo o uso de um agente complexante como a L-cisteína, previsto inicialmente não garante a estabilidade das várias formas de As (BARRA et al., 2000).

Embora as análises químicas realizadas potencializem alterações das formas químicas do As nas amostras de sedimento, considerando-se desde a etapa de coleta até a determinação do analito, fica mesmo assim evidenciada a possibilidade de se conduzir uma redução seletiva dos extratos de sedimento, sendo este um indicativo da ocorrência das formas inorgânicas de As^{3+} e As^{5+} . Através das concentrações obtidas de As total nas amostras de sedimento do Ribeirão Guamium, verificou-se que os extratos não reduzidos com a solução de iodeto de potássio/ácido ascórbico representaram uma parte do As presente nos extratos em que a redução foi efetuada. Assim, mesmo não podendo afirmar o grau em que a relação As^{3+}/As^{5+} tenha sido alterada nas amostras naturais das estações seca e chuvosa, sabe-se que no procedimento químico empregado com água régia, há uma diferença cinética na determinação dessas duas espécies inorgânicas de As. Isto porque, no caso do As^{3+} , a redução ocorre em ampla faixa de pHs, ao passo que para As^{5+} , há a necessidade das amostras estarem em elevada acidez e, antes de ocorrer a conversão para AsH_3 , a forma oxidada precisa ser reduzida a As^{3+} para depois ser reduzida pelo $NaBH_4$ (LOPEZ et al., 1992). Empregando-se o diagrama de estabilidade pH x Eh, era de se esperar, para a maioria das amostras, uma tendência à ocorrência preferencial do As^{5+} .

Em função da importância do estado de oxidação na toxicidade dos elementos químicos, a presente proposta possui potencialidades para realizar determinações qualitativas de espécies de As inorgânico, até que alternativas quantitativas possam ser efetuadas. O procedimento proposto deve incluir

formas de coleta que não induzam variações do estado de oxidação do elemento.

O método de determinação de As total empregado na análise de As mostrou-se exato e preciso em relação ao Material de Referência Certificado WQB-1 (Tabela 10), pois os teores totais obtidos para o elemento ($22,80 \pm 0,7 \mu\text{g g}^{-1}$ As) estiveram satisfatoriamente dentro do intervalo de concentração esperado ($23,00 \pm 1,84 \mu\text{g g}^{-1}$ As). Em relação às formas inorgânicas de As no CRM WQB-1, determinaram-se concentrações de $1,75 \mu\text{g g}^{-1}$ As^{3+} , quando este material foi submetido ao mesmo tratamento das amostras. Esta certeza analítica permite afirmar que através dos extratos obtidos, tanto da digestão total em meio de água régia, quanto do biodisponível, em meio de HCl a frio, foi possível distinguir-se qualitativamente as formas de As^{3+} e As^{5+} presentes nas amostras de sedimento. A exatidão dos resultados das formas químicas do As não pode ser comprovada, pois o CRM WQB-1 é certificado somente para teores totais. Ambos os procedimentos experimentais empregados nesta pesquisa foram dependentes de protocolos de coleta e preservação das amostras, o que pode ter contribuído para alterações da relação $\text{As}^{3+}/\text{As}^{5+}$ da amostra natural (BARRA et al., 2000).

Tabela 10. Teores de As total ($\mu\text{g g}^{-1}$) esperado e obtido para o Material de Referência Certificado WQB-1

Resultado esperado	Resultado obtido
$23,00 \pm 1,84$ As	$22,80 \pm 0,7$ As

O trabalho visou de alguma forma contribuir para a melhoria do protocolo de Valores-guia de Qualidade de Sedimentos (MOZETO, 2001), explorando procedimentos analíticos de relativa simplicidade, onde as facilidades de separação cromatográfica e/ou eletroforética não estão presentes, com vistas à especiação química de um elemento tóxico; produzindo assim, dados qualitativos do As de uma microbacia em elevado grau de alteração.

Esforços precisam ser direcionados para estudos da especiação química do As no ambiente, tarefa esta de conhecida complexidade (BARRA et al., 2000). Nesta busca, métodos eletrométricos de análises são promissores (SALAUN et al., 2007). Apesar das alterações da relação $\text{As}^{3+}/\text{As}^{5+}$ terem sido

encontradas no presente trabalho em relação às amostras naturais, a avaliação qualitativa proposta é um diferencial aos tradicionais protocolos analíticos, baseados apenas nos teores totais do elemento.

No caso do estabelecimento de VGQS, estes permitem reforçar a avaliação da toxicidade deste substrato, somados aos resultados obtidos nos bioensaios (MOZETO, 2001).

Com os resultados obtidos para as variáveis limnológicas, pode-se prever os impactos que as atividades antrópicas têm causado na região devido à forte urbanização e industrialização, além da agricultura. Entretanto, as altas concentrações encontradas de As na microbacia evidenciam uma preocupação e a necessidade de medidas de controle urgentes bem como a investigação de sua real origem neste ecossistema.

Cabe salientar que este é um trabalho inicial realizado nessa microbacia e, portanto, mais estudos que caracterizem a água, a matéria orgânica dissolvida e a mineralogia do sedimento devem ser realizados para conhecimento da real situação em que se encontra o Ribeirão Guamium e sua toxicidade à biota aquática e ao homem.

5.3. Testes de sensibilidade (controle positivo) dos organismos utilizados nos bioensaios

Os valores da CL₅₀; 24 h (protozoário *Paramecium caudatum*) e da CE(I)₅₀; 48 h (cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii*) dos testes de sensibilidade ao NaCl ficaram dentro da faixa de sensibilidade estabelecida para os mesmos, determinada após realização de testes preliminares, em condições de laboratório (ABNT, 2004; 2005). Os valores ficaram entre 3,0 - 3,7 g L⁻¹ NaCl para *P. caudatum* (Fig. 23) e 0,76 - 1,46 g L⁻¹ NaCl para *C. silvestrii* (Fig. 24), indicando que esses organismos estavam adequados para serem utilizados nos testes de toxicidade aguda realizados no presente trabalho, sendo que *C. silvestrii* foi mais sensível ao cloreto de sódio do que *P. caudatum*.

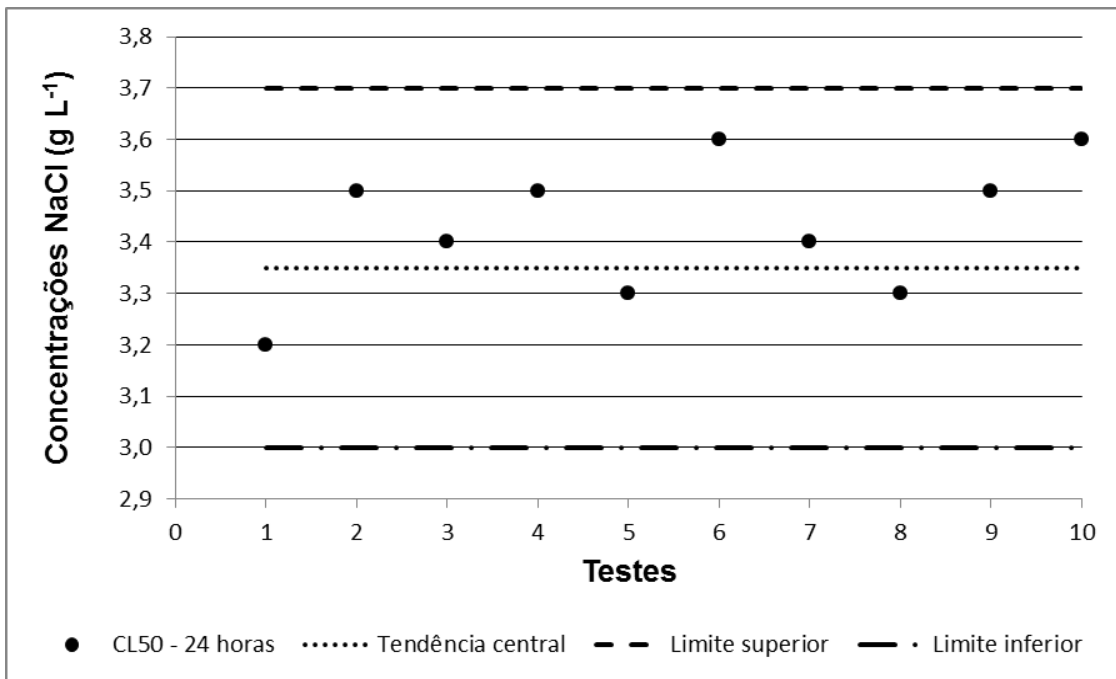


Figura 23. Faixa de sensibilidade do protozoário *P. caudatum* ao NaCl, onde Tendência central = média dos valores da CL₅₀; Limite superior = valor de dois desvios padrão superiores; Limite inferior = valor de dois desvios padrão inferiores

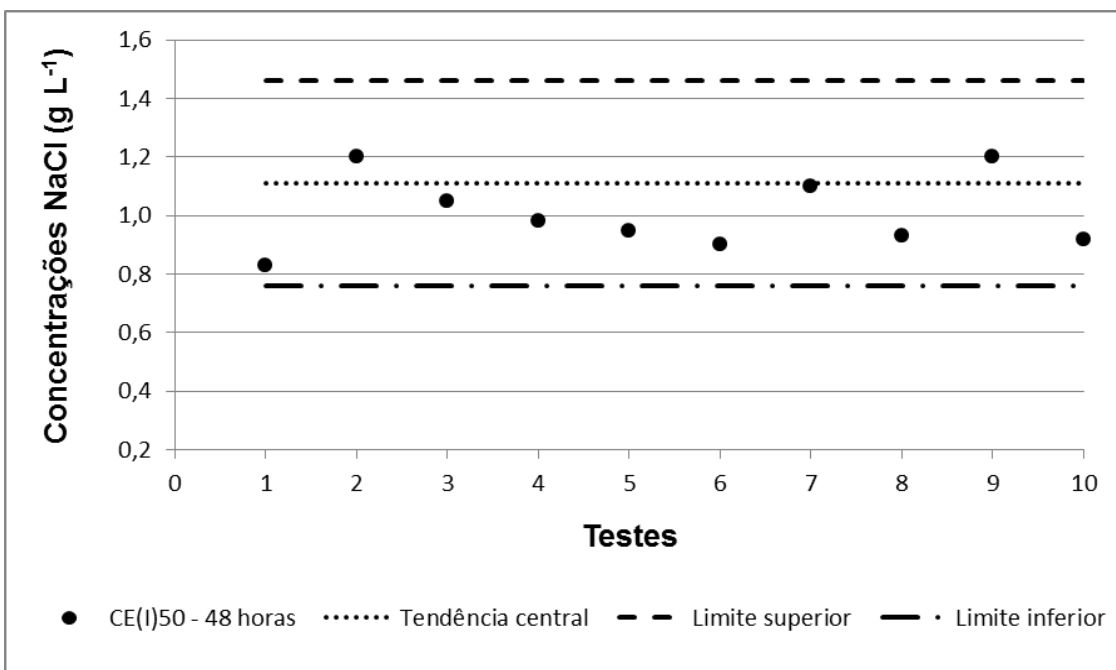


Figura 24. Faixa de sensibilidade do cladócero *C. silvestrii* ao NaCl, onde Tendência central = média dos valores da CE(I)₅₀; Limite superior = valor de dois desvios padrão superiores; Limite inferior = valor de dois desvios padrão inferiores

5.4. Bioensaios - efeitos do arsênio e das amostras de sedimento nas respostas biológicas do protozoário e do cladócero

5.4.1. Bioensaios para verificar a toxicidade das amostras de sedimento

Os resultados dos testes de toxicidade com sedimento utilizando o cladócero *Ceriodaphnia silvestrii* e o protozoário *Paramecium caudatum* nas amostras das duas estações de coleta são apresentados nas Figs. 25 e 26. A média de sobrevivência do cladócero variou entre 55 e 100% na estação seca e entre 84 e 100% na estação chuvosa. Já para o protozoário, a média durante as estações seca e chuvosa variou entre 96 e 100%.

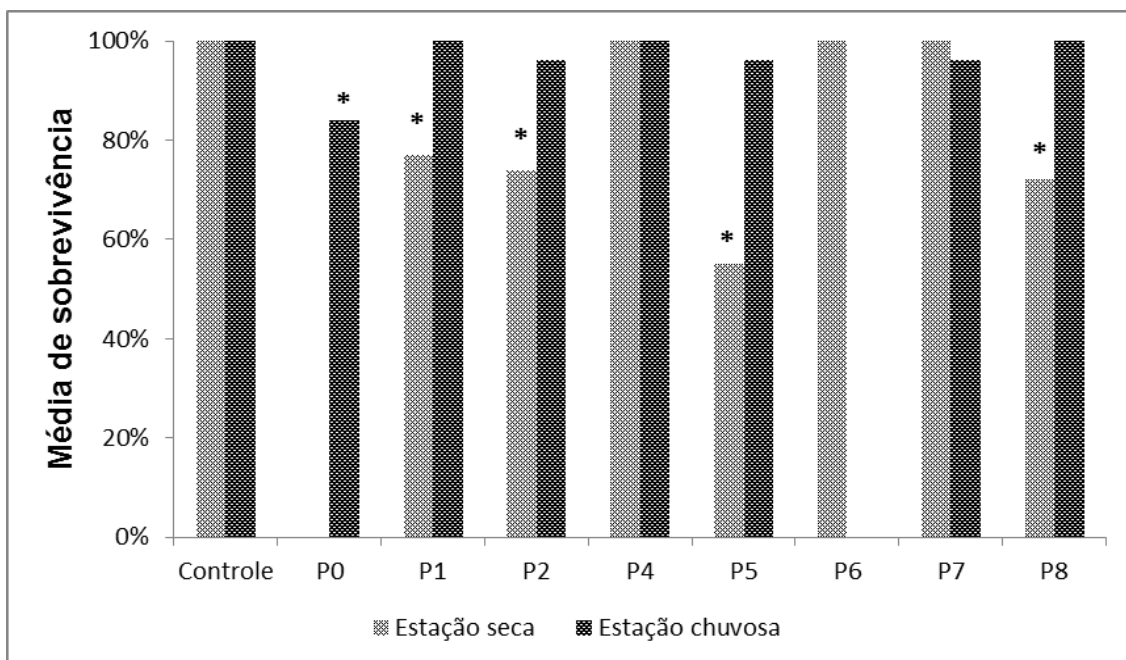


Figura 25. Média de sobrevivência do cladócero *C. silvestrii* ao teste de toxicidade com sedimento coletado nas estações seca (24/07/08) e chuvosa (09/03/09) nos diferentes pontos do Ribeirão Guamium, onde * = diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$). Os pontos não amostrados não foram coletados ou as amostras foram perdidas durante o transporte e armazenamento

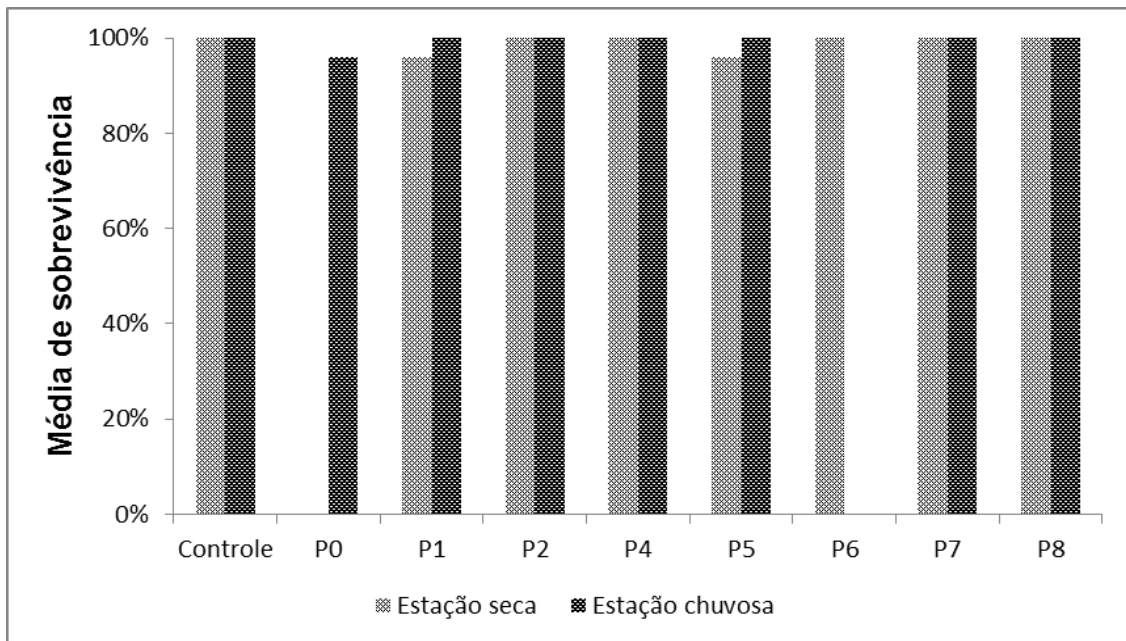


Figura 26. Média de sobrevivência do protozoário *P. caudatum* ao teste de toxicidade com sedimento coletado nas estações seca (24/07/08) e chuvosa (09/03/09) nos diferentes pontos do Ribeirão Guamium. Os pontos não amostrados não foram coletados ou as amostras foram perdidas durante o transporte e armazenamento

Nas Tabelas 11 e 12, encontram-se as concentrações totais de As no sobrenadante das amostras de sedimento ($\mu\text{g L}^{-1}$) dos pontos amostrados nas duas estações (seca e cheia).

Os Pontos 0, 1 e 5 foram os mais tóxicos à biota nas duas estações amostrais (Figs. 25 e 26 acima), e corresponderam àqueles com maiores concentrações de As total (Tabelas 7 e 8 do Tópico 5.2. acima). Estes pontos correspondem à nascente do Ribeirão Guamium (P0); ao bairro de Tanquinho (P1), constituído de vegetação arbustiva, com predominância de gramíneas, milho e cana; e ao Disque Animais (P5), com extensa área de pastagem e manchas de vegetação arbustiva, além da presença de indústrias metalúrgicas que ocasionam o despejo de resíduos gordurosos. As altas concentrações de As na nascente e no bairro de Tanquinho podem ser evidências de contaminação geológica e infiltração do lençol freático, visto serem pontos sem indícios de contaminação aparente, porém de pouca profundidade. Além disso, nas plantações de cana-de-açúcar da região, verifica-se o uso de herbicidas por agricultores que tem o As^{5+} como princípio ativo (Fig. 21 do Tópico 5.2.

acima), sendo esta a fonte mais provável de As encontrada no ambiente, caracterizando-se como uma fonte dispersiva e não pontual de poluentes. As menores concentrações de As total foram observadas no Ponto do Clube Atlético (P7), tanto na estação seca como na chuvosa (Tabelas 11 e 12).

Tabela 11. Concentrações de As total ($\mu\text{g L}^{-1}$) no sobrenadante das amostras de sedimento (água reconstituída) utilizado com o cladóceros *C. silvestrii* nas estações de seca (24/07/08) e cheia (09/03/09). Os pontos não amostrados não foram coletados ou as amostras foram perdidas durante o transporte e armazenamento

Pontos	Estação seca	Estação chuvosa
Nascente (P0)	-	1,81
Bairro de Tanquinho (P1)	2,07	1,95
Usina Capuava (P2)	1,57	1,49
Fazenda da APTA (P4)	1,90	1,50
Disque Animais (P5)	1,91	1,63
Condomínio (P6)	1,41	-
Clube Atlético (P7)	1,11	1,20
Matadouro (P8)	1,34	1,42

Tabela 12. Concentrações de As total ($\mu\text{g L}^{-1}$) no sobrenadante das amostras de sedimento (água Minalba[®] estéril) utilizado com o protozoário *P. caudatum* nas estações de seca (24/07/08) e cheia (09/03/09). Os pontos não amostrados não foram coletados ou as amostras foram perdidas durante o transporte e armazenamento

Pontos	Estação seca	Estação chuvosa
Nascente (P0)	-	1,87
Bairro de Tanquinho (P1)	2,92	2,55
Usina Capuava (P2)	1,51	1,44
Fazenda da APTA (P4)	1,24	1,48
Disque Animais (P5)	1,80	1,56
Condomínio (P6)	1,66	-
Clube Atlético (P7)	1,07	1,13
Matadouro (P8)	1,34	1,23

As amostras de sedimento coletadas durante a estação seca apresentaram níveis de toxicidade maiores que as coletadas durante a estação chuvosa para ambos os organismos-teste. Tal fato pode ser explicado pela diluição dos poluentes devido à maior entrada de água no sistema no período de chuvas, o que também faz aumentar a vazão do rio.

Para *C. silvestrii*, o sobrenadante das amostras de sedimento do Ponto da Nascente (P0), coletadas na estação chuvosa; e dos Pontos do Bairro de Tanquinho (P1), da Usina Capuava (P2), do Disque Animais (P5) e do

Matadouro (P8), coletadas na estação seca, ocasionaram toxicidade aguda ao cladóceros após 48 h de exposição (Fig. 25 acima). Dentre os impactos ambientais observados nestes pontos, destacam-se a substituição da vegetação ripária por pastagens, plantações de milho, cana e eucalipto, descarga de esgoto doméstico diretamente no rio, além dos pontos da nascente e do bairro de Tanquinho, nos quais foram detectadas altas concentrações de As.

O sobrenadante das amostras de sedimento dos dois períodos não apresentou níveis de toxicidade agudos significativos para *P. caudatum*, após 24 h de exposição (Fig. 26 acima); porém, vale ressaltar que a exposição crônica poderia estar ocasionando danos à reprodução e desenvolvimento desses organismos. Uma hipótese para a sobrevivência desse organismo seria o fato dessa espécie ter grande tolerância à ambientes ricos em matéria orgânica como nos sedimentos, em comparação à espécie planctônica *C. silvestrii*. Segundo Foissner e Berger (1996), essa espécie é considerada a-mesosapróbia. Isto justifica a utilização desse organismo em testes de toxicidade em amostras de sedimento e em ambientes impactados por poluição orgânica. Dessa maneira, os efeitos detectados seriam devido a contaminantes encontrados nessas amostras e não devido à matéria orgânica presente. Por outro lado, os resultados das altas concentrações de As total encontradas nas amostras de sedimento parecem revelar que ele não seria o organismo mais adequado para monitorar este semi-metal, uma vez que ele parece ser resistente.

De modo geral, os resultados dos testes de toxicidade com os organismos foram compatíveis às análises das concentrações de As nas amostras de sedimento e no sobrenadante, visto que nos pontos de maior concentração de As total, houve maior toxicidade. Evidentemente mais ensaios seriam necessários para uma maior certeza dessas afirmações.

Apesar de termos obtido as maiores concentrações de As total no Ponto do Bairro de Tanquinho (P1), o Ponto do Disque Animais (P5) apresentou maior toxicidade para *C. silvestrii* na estação seca. Tal fato é um indicativo de que a toxicidade dos sedimentos da bacia do Ribeirão Guamium não seja causada somente pelo As, mas também por outros contaminantes, confirmando-se com a maior temperatura encontrada neste ponto nas duas

estações, pela degradação de compostos poluentes devido à alta atividade microbiana.

Considerando os valores máximos de As total permitidos em águas doces das Classes 1 e 2 ($10 \mu\text{g L}^{-1}$), de acordo com a Resolução do CONAMA nº 357/2005, destinadas ao abastecimento para consumo humano, após tratamento simplificado e à proteção das comunidades aquáticas, todos os valores encontrados no sobrenadante das amostras de sedimento se encontraram abaixo do limite máximo permitido.

Nos trabalhos seguintes encontrados na literatura, os níveis de As total encontrados na água de outras localidades do Brasil e do mundo foram excessivamente altos. No entanto, mesmo os valores do sobrenadante do sedimento do Ribeirão Guamium estando dentro dos padrões, alguns pontos foram tóxicos, especialmente para o cladóceros *C. silvestrii*, evidenciando efeitos que poderiam ser agravados em uma exposição crônica, inclusive ao protozoário *P. caudatum*. Ressalta-se a interferência de outros elementos químicos presentes no sobrenadante que poderiam estar afetando a resposta dos organismos, mesmo os testes sendo realizados em condições de cultivo favoráveis.

Borba et al. (2003a) revelaram sinais de contaminação por As no solo e na água utilizada por moradores do Quadrilátero Ferrífero, que abrange as cidades de Ouro Preto, Santa Bárbara, Nova Lima e outras cidades históricas, em Minas Gerais. Os resultados constatados revelaram contaminação por As na urina de crianças entre sete e onze anos, matriculadas em duas escolas no município de Nova Lima, nas quais 20% das crianças apresentavam concentrações de As na urina acima de $40 \mu\text{g L}^{-1}$.

Inicialmente detectada em 1993, a contaminação por As dos aquíferos de Bangladesh afeta atualmente milhões de pessoas. O As presente na água de poços, ainda consumida diariamente por cerca de 50 milhões de pessoas como potável, apresenta níveis de As muito superiores aos níveis de segurança estabelecidos pelo governo local (limite de $50 \mu\text{g L}^{-1}$, 5 vezes superior ao limite estabelecido pela OMS de $10 \mu\text{g L}^{-1}$) (RODRIGUES, 2010).

Com base no último relatório anual sobre a qualidade da água em Portugal, divulgado pelo Instituto Regulador de Águas e Resíduos (IRAR), cerca de 60 mil portugueses consumiram água contaminada com doses

excessivas de As em 2004. As maiores concentrações de As foram observadas em Vila Flor, distrito de Bragança, onde chegou a $540 \mu\text{g L}^{-1}$ e em Benlhevai com $330 \mu\text{g L}^{-1}$ (GARCIA, 2010).

As variáveis pH, condutividade e dureza monitoradas no sobrenadante das amostras de sedimento (água de cultivo, no caso a água reconstituída) dos ensaios de toxicidade agudos com *C. silvestrii* não variaram muito entre as coletas e entre o início e o final dos testes, porém entre os pontos houve diferenças significativas com pH inicial entre 4,88 - 7,68; condutividade inicial entre $74,2 - 162,3 \mu\text{S cm}^{-1}$ e dureza inicial entre $20 - 74 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$, que poderiam estar influenciando os resultados (Tabelas 13 e 14). Exemplo disso são os baixos valores de dureza e pH encontrados especialmente nos Pontos da Nascente (P0), do Bairro de Tanquinho (P1) e do Disque Animais (P5), os mais tóxicos ao cladóceros *C. silvestrii*. Nestes organismos, quanto mais baixos forem os valores de dureza, mais alta será a toxicidade, de acordo com a ABNT (2004; 2005), na qual os valores de dureza requeridos para o cultivo estão entre 40 e $48 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$. Os mais baixos valores de pH do sobrenadante (pH ácido) proporcionam maior liberação de íons e consequente toxicidade comparados aos altos valores de pH (pH básico). No caso do *P. caudatum*, o pH inicial do sobrenadante (água de cultivo, no caso a água Minalba[®] estéril) entre os pontos variou entre 5,75 - 7,71; sendo semelhante entre as coletas e entre o início e o final dos testes (Tabela 15).

Os resultados dos testes de toxicidade com o sobrenadante das amostras de sedimento do Ribeirão Guamium e os valores das respectivas variáveis físico-químicas provavelmente irão variar em relação a outros locais.

Tabela 13. Valores de pH, condutividade e dureza nos ensaios de toxicidade aguda com *C. silvestrii*, utilizando o sobrenadante das amostras de sedimento (água reconstituída) na estação seca, em 24 de julho de 2008. Os Pontos da Nascente (P0) e da Estação de Tratamento de Esgoto (P3) não foram coletados ou as amostras foram perdidas durante o transporte e armazenamento. I = inicial; F = final

Pontos	pH		Condutividade ($\mu\text{S cm}^{-1}$)		Dureza (mg $\text{CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$)	
	I	F	I	F	I	F
Controle	7,31	7,63	92,7	98,6	44	38
Bairro de Tanquinho (P1)	6,00	7,39	74,2	88,1	28	34
Usina Capuava (P2)	7,53	7,92	131,2	131,9	58	64
Fazenda da APTA (P4)	7,57	7,77	93,0	102,9	42	48
Disque Animais (P5)	5,31	7,30	129,4	139,9	44	52
Condomínio (P6)	7,40	7,92	95,9	105,4	32	44
Clube Atlético (P7)	7,68	7,90	92,4	103,4	42	44
Matadouro (P8)	7,28	7,99	158,0	150,2	66	70

Tabela 14. Valores de pH, condutividade e dureza nos ensaios de toxicidade aguda com *C. silvestrii*, utilizando o sobrenadante das amostras de sedimento (água reconstituída) na estação chuvosa, em 9 de março de 2009. Os Pontos da Estação de Tratamento de Esgoto (P3) e do Condomínio (P6) não foram coletados ou as amostras foram perdidas durante o transporte e armazenamento. I = inicial; F = final

Pontos	pH		Condutividade ($\mu\text{S cm}^{-1}$)		Dureza ($\text{mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$)	
	I	F	I	F	I	F
Controle	7,50	7,64	112,1	124,5	42	44
Nascente (P0)	4,88	6,95	82,2	90,0	20	24
Bairro de Tanquinho (P1)	6,82	7,81	124,0	128,1	50	46
Usina Capuava (P2)	6,99	7,81	162,3	162,4	72	68
Fazenda da APTA (P4)	7,61	7,93	119,9	127,5	50	50
Disque Animais (P5)	5,37	7,32	109,2	114,1	32	34
Clube Atlético (P7)	7,52	7,93	134,0	138,6	74	58
Matadouro (P8)	7,48	7,98	144,8	145,0	64	58

Tabela 15. Valores de pH nos ensaios de toxicidade aguda com *P. caudatum*, utilizando o sobrenadante das amostras de sedimento (água Minalba® estéril) nas estações seca (24/07/08) e chuvosa (09/03/09). Os pontos não amostrados não foram coletados ou as amostras foram perdidas durante o transporte e armazenamento. I = inicial; F = final

Pontos	pH (Estação seca)		pH (Estação chuvosa)	
	I	F	I	F
Controle	8,76	8,04	8,11	8,24
Nascente (P0)	-	-	6,86	7,65
Bairro de Tanquinho (P1)	6,64	7,29	6,83	8,05
Usina Capuava (P2)	7,59	7,92	7,64	8,01
Fazenda da APTA (P4)	7,71	8,16	7,50	8,11
Disque Animais (P5)	5,75	6,80	6,31	7,40
Condomínio (P6)	7,42	8,05	-	-
Clube Atlético (P7)	7,68	8,18	7,68	8,24
Matadouro (P8)	7,34	8,41	7,44	8,26

Apesar dos parâmetros físico-químicos variarem entre os pontos de coleta, principalmente naqueles com maior concentração de As total (P0, P1 e P5), podendo ter ocasionado interferência direta ou indireta nos resultados de toxicidade, alguns pontos (P2 e P8) foram tóxicos mesmo apresentando

valores de variáveis limnológicas semelhantes a outros pontos significativamente não tóxicos.

Os resultados obtidos nos bioensaios de toxicidade aguda com o sobrenadante do sedimento, em especial os dos cladóceros, indicam deterioração da qualidade desses substratos no corpo de água estudado, especialmente em alguns pontos, mostrando a necessidade da realização de ações para minimizar os despejos de contaminantes, além da manutenção e/ou recomposição da mata ciliar nesse ecossistema.

5.4.2. Bioensaios com o protozoário *Paramecium caudatum* para verificar a toxicidade aguda do arsênio

Através de ensaios de otimização, Miranda et al. (2008) definiram que as melhores condições de cultivo dessa linhagem de *P. caudatum*, considerando-se as médias das densidades populacionais, foram verificadas a pH 8,0 e a 30 °C, sendo os organismos inoculados no escuro. A partir da curva de crescimento de *P. caudatum*, obtida na condição ótima de cultivo determinada no experimento de otimização de cultivo, a fase lag durou aproximadamente 36 horas, quando iniciou a fase log, que se estendeu até 96 horas após o inóculo. Os experimentos no presente estudo foram realizados com protozoários obtidos na fase log de crescimento (72 horas), em culturas feitas nas mesmas condições (temperatura de 30 °C, pH 8, no escuro). Segundo esses mesmos autores, o tempo de geração calculado a partir dessa curva foi de 5,3 horas.

Paramecium caudatum apresentou sensibilidade aguda ao arsênio nas formas inorgânicas, arsenito (As^{3+}) e arsenato (As^{5+}), nas concentrações testadas. A faixa de sensibilidade obtida para *P. caudatum* exposto ao As^{3+} foi de 0,6 a 0,8 mg L⁻¹, no período de 2 h, enquanto o valor médio da CL₅₀; 2 h foi de 0,78 ±0,0149 mg L⁻¹ com coeficiente de variação de 1,91%. A faixa de sensibilidade foi obtida através da CENO(I); 0,6 mg L⁻¹ e da CEO(I); 0,8 mg L⁻¹ (ABNT, 2004; 2005). Com os resultados da CL₅₀, foi elaborado um gráfico-controle, utilizando a média e os valores correspondentes a dois desvios padrão superiores e inferiores em relação à média (Fig. 27). Os valores da CL₅₀ e os intervalos de confiança obtidos nos testes realizados estão apresentados na Tabela 16.

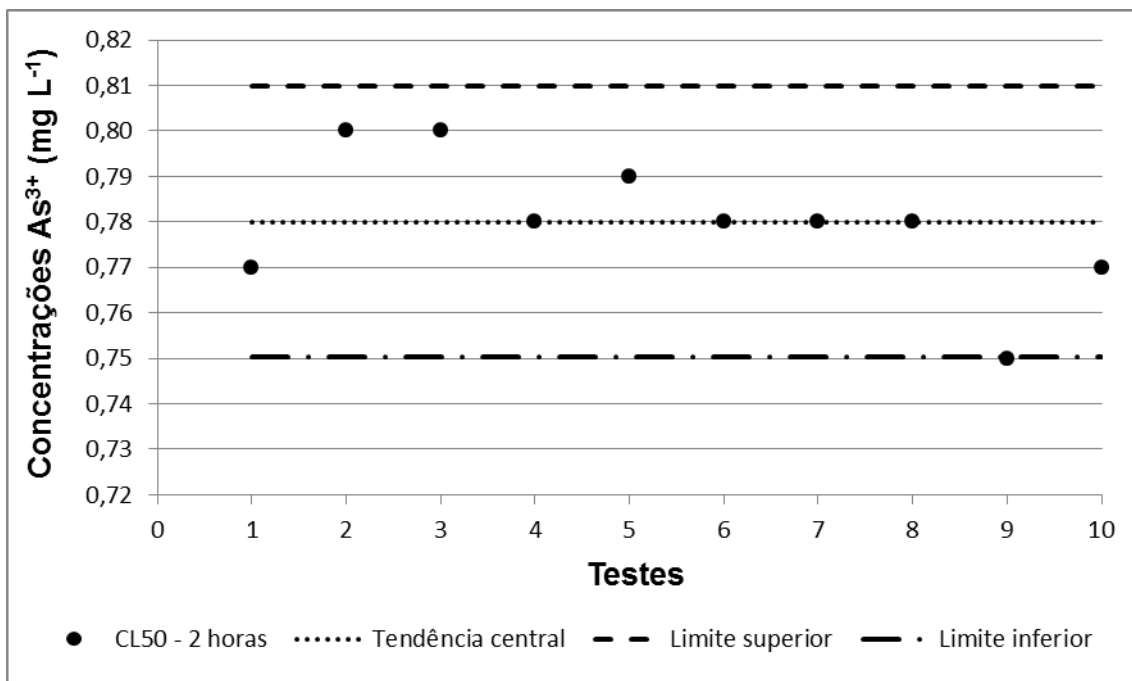


Figura 27. Faixa de sensibilidade do protozoário *P. caudatum* ao arsenito (As^{3+}), de acordo com os valores da CL_{50} ; 2 h obtidos no decorrer de 10 testes, onde Tendência central = média dos valores da CL_{50} ; Limite superior = valor de dois desvios padrão superiores; Limite inferior = valor de dois desvios padrão inferiores

Tabela 16. Valores da CL_{50} ($mg L^{-1}$) As^{3+} e respectivos intervalos de confiança em testes de toxicidade aguda com duração de 2 h, utilizando o protozoário *P. caudatum*

Testes	CL_{50} ; 2 h ($mg L^{-1}$)	Intervalo de confiança
1	0,77	0,76 - 0,78
2	0,80	0,79 - 0,81
3	0,80	0,79 - 0,81
4	0,78	0,76 - 0,79
5	0,79	0,78 - 0,80
6	0,78	0,77 - 0,79
7	0,78	0,77 - 0,79
8	0,78	0,77 - 0,80
9	0,75	0,74 - 0,76
10	0,77	0,76 - 0,78

Na Tabela 17, encontram-se os valores da CL₅₀ (mg L⁻¹) As³⁺ em leituras a cada 2 h durante o período de 24 h, que permitem predizer valores da CL₅₀ nesta faixa de As³⁺ ao longo do tempo. Os valores da CL₅₀ e os intervalos de confiança obtidos nos testes realizados estão apresentados na Tabela 18.

Tabela 17. Mortalidade do protozoário *P. caudatum* ao As³⁺ durante 24 h

Tempo (h)	Mortalidade (%)						CL ₅₀ (mg L ⁻¹)
	Controle	0,60	0,65	0,70	0,75	0,80	(mg L ⁻¹)
2	0	0	0	0	20	70	0,78
4	0	0	0	0	50	100	0,75
6	0	0	0	30	50	100	0,73
8	0	0	0	20	70	100	0,73
10	0	0	0	20	70	100	0,73
12	0	0	0	30	80	100	0,72
14	0	0	0	40	80	100	0,71
16	0	0	0	40	80	100	0,71
18	0	0	0	50	90	100	0,70
20	0	0	10	50	100	100	0,69
22	0	0	0	60	100	100	0,69
24	0	0	20	50	100	100	0,69

Tabela 18. Valores da CL_{50} (mg L^{-1}) As^{3+} e respectivos intervalos de confiança em testes de toxicidade aguda com duração de 24 h, utilizando o protozoário *P. caudatum*

Tempo (h)	CL_{50} ; 24 h (mg L^{-1})	Intervalo de confiança
2	0,78	0,76 - 0,80
4	0,75	0,73 - 0,77
6	0,73	0,71 - 0,76
8	0,73	0,71 - 0,75
10	0,73	0,71 - 0,75
12	0,72	0,70 - 0,74
14	0,71	0,69 - 0,73
16	0,71	0,69 - 0,73
18	0,70	0,69 - 0,72
20	0,69	0,68 - 0,71
22	0,69	0,68 - 0,71
24	0,69	0,67 - 0,71

A faixa de sensibilidade obtida para *P. caudatum* exposto ao As^{5+} foi de 2 a 3 mg L^{-1} , no período de 2 h, enquanto o valor médio da CL_{50} ; 2 h foi de $2,55 \pm 0,0116 \text{ mg L}^{-1}$ com coeficiente de variação de 0,45%. A faixa de sensibilidade foi obtida através da CENO(I); 2 mg L^{-1} e da CEO(I); 3 mg L^{-1} (ABNT, 2004; 2005). Com os resultados da CL_{50} , foi elaborado um gráfico-controle, utilizando a média e os valores correspondentes a dois desvios padrão superiores e inferiores em relação à média (Fig. 28). Os valores da CL_{50} e os intervalos de confiança obtidos nos testes realizados estão apresentados na Tabela 19.

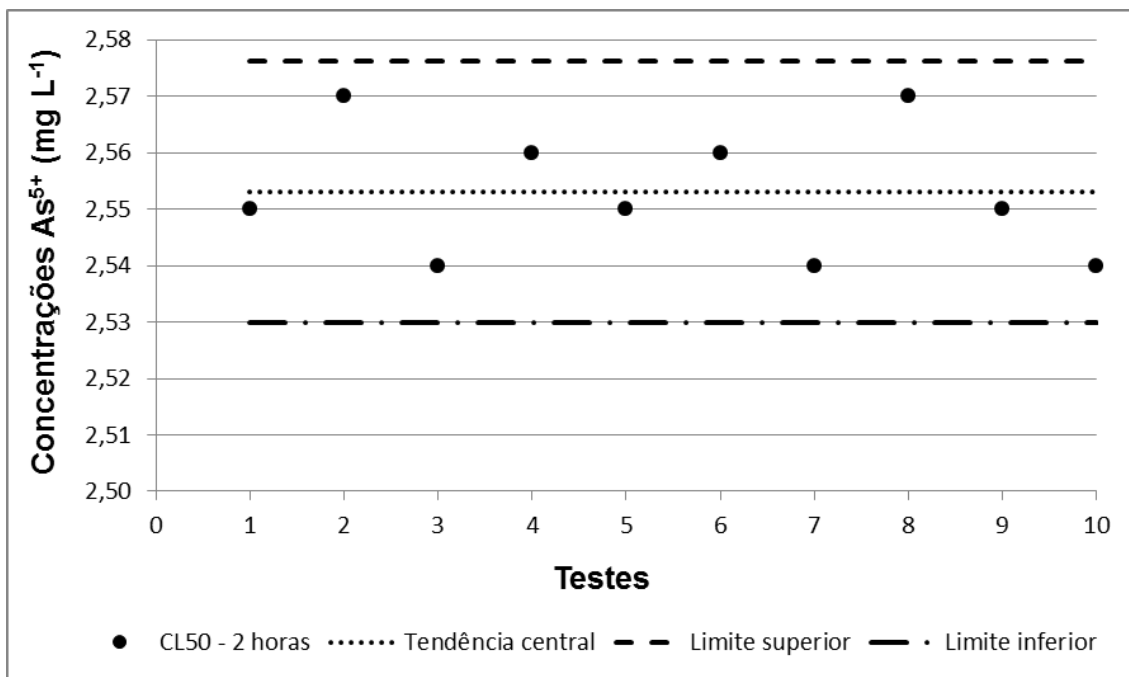


Figura 28. Faixa de sensibilidade do protozoário *P. caudatum* ao arsenato (As^{5+}), de acordo com os valores da CL_{50} ; 2 h obtidos no decorrer de 10 testes, onde Tendência central = média dos valores da CL_{50} ; Limite superior = valor de dois desvios padrão superiores; Limite inferior = valor de dois desvios padrão inferiores

Tabela 19. Valores da CL_{50} ($mg L^{-1}$) As^{5+} e respectivos intervalos de confiança em testes de toxicidade aguda com duração de 2 h, utilizando o protozoário *P. caudatum*

Testes	CL_{50} ; 2 h ($mg L^{-1}$)	Intervalo de confiança
1	2,55	2,49 - 2,60
2	2,57	2,51 - 2,62
3	2,54	2,48 - 2,59
4	2,56	2,51 - 2,62
5	2,55	2,51 - 2,60
6	2,56	2,51 - 2,61
7	2,54	2,49 - 2,59
8	2,57	2,52 - 2,62
9	2,55	2,49 - 2,61
10	2,54	2,48 - 2,60

Na Tabela 20, encontram-se os valores da CL_{50} ($mg L^{-1}$) As^{5+} em leituras a cada 2 h durante o período de 24 h, que permitem predizer valores da CL_{50} nesta faixa de As^{5+} ao longo do tempo. Os valores da CL_{50} e os intervalos de confiança obtidos nos testes realizados estão apresentados na Tabela 21.

Tabela 20. Mortalidade do protozoário *P. caudatum* ao As^{5+} durante 24 h

Tempo (h)	Mortalidade (%)						CL_{50} ($mg L^{-1}$)
	Controle	2,00	2,25	2,50	2,75	3,00	($mg L^{-1}$)
2	0	0	0	40	80	100	2,57
4	0	0	0	50	100	100	2,49
6	0	0	0	50	100	100	2,49
8	0	0	0	60	100	100	2,47
10	0	0	0	60	100	100	2,47
12	0	0	0	70	100	100	2,44
14	0	0	0	70	100	100	2,44
16	0	0	0	80	100	100	2,42
18	0	0	0	80	100	100	2,42
20	0	0	0	80	100	100	2,42
22	0	0	0	90	100	100	2,40
24	0	0	0	90	100	100	2,40

Tabela 21. Valores da CL_{50} (mg L^{-1}) As^{5+} e respectivos intervalos de confiança em testes de toxicidade aguda com duração de 24 h, utilizando o protozoário *P. caudatum*

Tempo (h)	$CL_{50}; 24 \text{ h}$ (mg L^{-1})	Intervalo de confiança
2	2,57	2,47 - 2,67
4	2,49	2,42 - 2,57
6	2,49	2,42 - 2,57
8	2,47	2,39 - 2,55
10	2,47	2,39 - 2,55
12	2,44	2,37 - 2,52
14	2,44	2,37 - 2,52
16	2,42	2,36 - 2,48
18	2,42	2,36 - 2,48
20	2,42	2,36 - 2,48
22	2,40	2,35 - 2,44
24	2,40	2,35 - 2,44

Comparando-se os valores da CL_{50} do As^{3+} e do As^{5+} , constata-se que o primeiro apresenta toxicidade 3 vezes maior do que o segundo, visto que a forma reduzida é significativamente mais tóxica que a oxidada. Não foram encontrados trabalhos na literatura relacionados à toxicidade de As em protozoários, especialmente considerando-se suas diferentes formas inorgânicas. Um trabalho de toxicidade aguda com Cd^{2+} foi determinado no protozoário ciliado *Paramecium bursaria*, através de um ensaio que envolveu a exposição dos organismos a seis diferentes concentrações do metal por um

período de 24 horas (WANICK et al., 2008). *P. bursaria* apresentou uma CL_{50} ; 24 h de $0,64 \text{ mg L}^{-1}$. Comparando-se com os valores da CL_{50} ; 24 h do As^{3+} no protozoário ciliado *P. caudatum*, o valor obtido ficou relativamente próximo ($0,69 \text{ mg L}^{-1}$), sendo ambas consideradas substâncias muito tóxicas.

Os valores iniciais de pH nas concentrações de As^{3+} variaram entre 5,0 e 6,0 e nas concentrações de As^{5+} entre 4,0 e 6,0; aumentando de forma inversa aos valores das concentrações. Alves et al. (2009) realizaram testes de cultivo com o protozoário *P. caudatum* utilizando o meio de cultura descrito no presente trabalho, após 24 horas, testando diferentes pHs, e verificaram a sobrevivência de organismos da cultura em pH 3,0. Com esse mesmo tempo de cultivo, o pH 5,0 foi excelente para o crescimento desse protozoário e valores intermediários foram obtidos em pHs superiores até 11,0. Assim, para os experimentos com o As^{3+} (pHs entre 5,0 e 6,0) e o As^{5+} (pHs entre 4,0 e 6,0), conclui-se que o pH não contribuiu primariamente para a letalidade dos protozoários. Na literatura, segundo Heydarnejad (2008) e Doughty (1986), a faixa de sobrevivência desse protozoário se encontra entre 4,7 e 9,7, e entre 4,0 e 10,0, respectivamente; faixa semelhante à encontrada no trabalho de Alves et al. (2009).

5.4.3. Bioensaios com o cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* para verificar a toxicidade aguda do arsênio

Ceriodaphnia silvestrii também apresentou sensibilidade aguda ao arsênio nas formas de arsenito (As^{3+}) e de arsenato (As^{5+}) nas concentrações testadas. A faixa de sensibilidade obtida para *C. silvestrii* exposta ao As^{3+} foi de 10^{-6} a $10^{-1} \text{ mg L}^{-1}$, no período de 48 h, enquanto o valor médio da $CE(I)_{50}$; 48 h foi de $0,0006 \pm 0,0003 \text{ mg L}^{-1}$ com coeficiente de variação de 46,52%. A faixa de sensibilidade foi obtida através da $CENO(I)$; $10^{-6} \text{ mg L}^{-1}$ e da $CEO(I)$; $10^{-1} \text{ mg L}^{-1}$ (ABNT, 2004; 2005). Com os resultados da $CE(I)_{50}$, foi elaborado um gráfico-controle, utilizando a média e os valores correspondentes a dois desvios padrão superiores e inferiores em relação à média (Fig. 29). Os valores da $CE(I)_{50}$ e os intervalos de confiança obtidos nos testes realizados estão apresentados na Tabela 22.

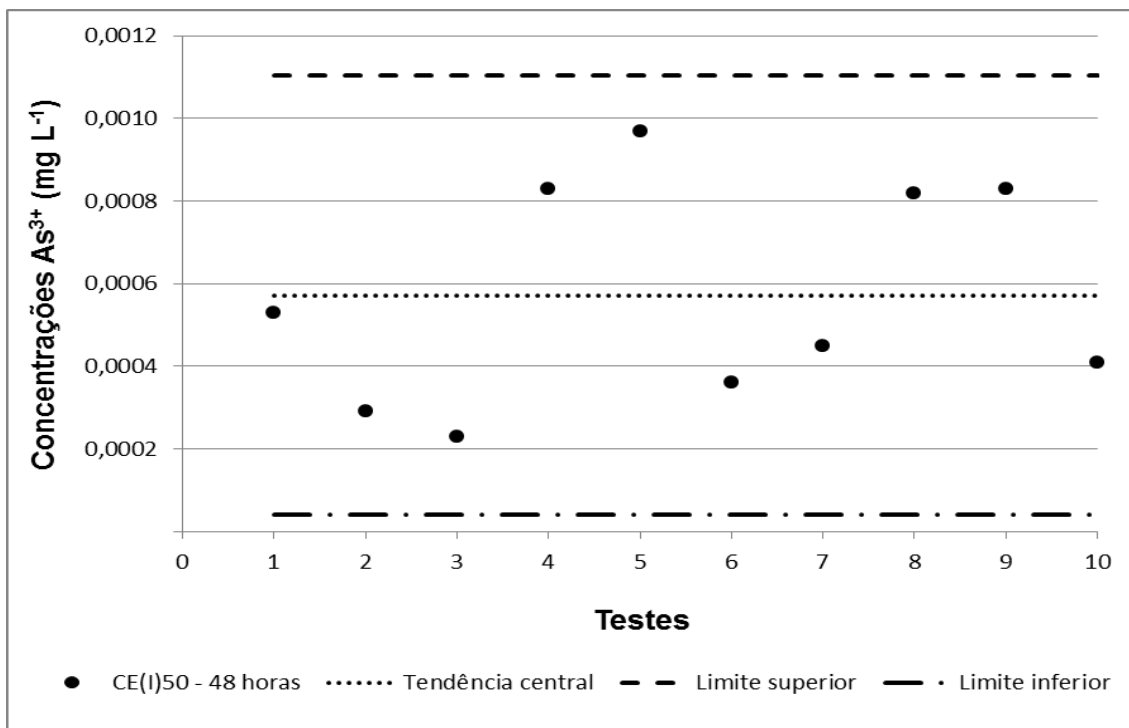


Figura 29. Faixa de sensibilidade do cladóceros *C. silvestrii* ao arsenito (As^{3+}), de acordo com os valores da $CE(I)_{50}$; 48 h obtidos no decorrer de 10 testes, onde Tendência central = média dos valores da $CE(I)_{50}$; Limite superior = valor de dois desvios padrão superiores; Limite inferior = valor de dois desvios padrão inferiores

Tabela 22. Valores da $CE(I)_{50}$ ($mg L^{-1}$) As^{3+} e respectivos intervalos de confiança em testes de toxicidade aguda com duração de 48 h, utilizando o cladóceros *C. silvestrii*

Testes	$CE(I)_{50}$; 48 h ($mg L^{-1}$)	Intervalo de confiança
1	0,00053	0,00019 - 0,00152
2	0,00029	0,00006 - 0,00129
3	0,00023	0,00006 - 0,00094
4	0,00083	0,00031 - 0,00222
5	0,00097	0,00034 - 0,00279
6	0,00036	0,00013 - 0,00102
7	0,00045	0,00016 - 0,00128
8	0,00082	0,00031 - 0,00214
9	0,00083	0,00036 - 0,00189
10	0,00041	0,00015 - 0,00110

A faixa de sensibilidade obtida para *C. silvestrii* exposta ao As^{5+} foi de 0,005 a 1 $mg L^{-1}$, no período de 48 h, enquanto o valor médio da $CE(I)_{50}$; 48 h foi de $0,078 \pm 0,0148 mg L^{-1}$ com coeficiente de variação de 18,92%. A faixa de sensibilidade foi obtida através da $CENO(I)$; $0,005 mg L^{-1}$ e da $CEO(I)$; $1 mg L^{-1}$ (ABNT, 2004; 2005). Com os resultados da $CE(I)_{50}$, foi elaborado um gráfico-controle, utilizando a média e os valores correspondentes a dois desvios padrão superiores e inferiores em relação à média (Fig. 30). Os valores da $CE(I)_{50}$ e os intervalos de confiança obtidos nos testes realizados estão apresentados na Tabela 23.

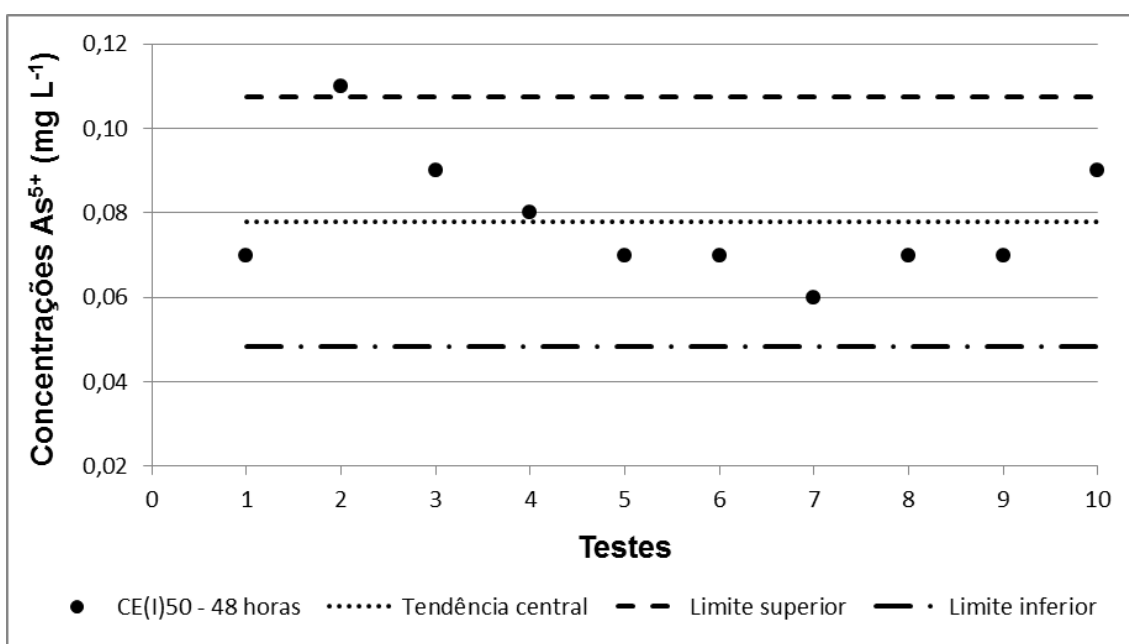


Figura 30. Faixa de sensibilidade do cladócero *C. silvestrii* ao arsenato (As^{5+}), de acordo com os valores da $CE(I)_{50}$; 48 h obtidos no decorrer de 10 testes, onde Tendência central = média dos valores da $CE(I)_{50}$; Limite superior = valor de dois desvios padrão superiores; Limite inferior = valor de dois desvios padrão inferiores

Tabela 23. Valores da CE(I)₅₀ (mg L⁻¹) As⁵⁺ e respectivos intervalos de confiança em testes de toxicidade aguda com duração de 48 h, utilizando o cladóceros *C. silvestrii*

Testes	CE(I) ₅₀ ; 48 h (mg L ⁻¹)	Intervalo de confiança
1	0,07	0,05 - 0,10
2	0,11	0,07 - 0,16
3	0,09	0,06 - 0,13
4	0,08	0,05 - 0,12
5	0,07	0,05 - 0,10
6	0,07	0,05 - 0,10
7	0,06	0,04 - 0,09
8	0,07	0,04 - 0,11
9	0,07	0,04 - 0,12
10	0,09	0,06 - 0,14

À semelhança dos resultados obtidos para *P. caudatum*, constata-se que o As³⁺ é também mais tóxico do que o As⁵⁺ para *C. silvestrii*. Porém, esta toxicidade se manifesta neste organismo em uma razão significativamente maior, cerca de 130 vezes. Considerando os valores da CE(I)₅₀ e CL₅₀ determinados, pode-se concluir que o valor máximo (0,01 mg L⁻¹) permissível de As total, estabelecidos pela Resolução do CONAMA n° 357/2005 para as águas doces das Classes 1 e 2 é adequado, com exceção da sensibilidade de *C. silvestrii* ao As³⁺, este poderia ser reduzido para maior segurança e

proteção das comunidades aquáticas, visto ser bastante tóxico para esse organismo-teste. Em relação à literatura, apenas um trabalho foi encontrado relacionado à toxicidade de As em cladóceros, especialmente relevando-se suas diferentes formas inorgânicas como no presente trabalho para comparações. *Daphnia magna* tem sido comumente utilizada como indicador de toxicidade aquática e métodos padronizados têm sido desenvolvidos para testes de toxicidade aguda (USEPA, 1985). Para o As^{3+} e As^{5+} , as médias da CL_{50} foram de 4,4 e 7,4 $mg L^{-1}$, respectivamente (USEPA, 1984). Comparando-se os valores aos do cladóceros *C. silvestrii* e do protozoário *P. caudatum*, estes foram mais sensíveis às formas inorgânicas.

No entanto, vários trabalhos relacionados à toxicidade de As em peixes foram encontrados, permitindo ter uma idéia comparativa da toxicidade deste elemento em relação a outros níveis tróficos.

A maior parte dos dados sobre os efeitos do As em peixes está baseada em testes de toxicidade aguda por 96 horas, e alguns poucos têm avaliado os efeitos sub-letais no crescimento, comportamento, fertilização e eclosão de ovos (NICHOLS et al., 1984). A toxicidade letal do As trivalente (As_2O_3 CL_{50} ; 96 h) para peixe de água doce varia na ordem de 10,8 a 91,0 $mg L^{-1}$ (WHO, 2001), sendo que para o salmão juvenil *Oncorhynchus tshawytscha*, esta concentração foi estimada experimentalmente em 25,1 $mg L^{-1}$, variando entre 19,3 - 32,7 $mg L^{-1}$ seguindo exposição em modelo estático (HAMILTON & BUHL, 1990). Os mesmos autores citam concentrações letais de arsenito de sódio variando de 42,1 - 57,9 $mg L^{-1}$ para experimentos com alevinos de salmão *Oncorhynchus kisutch*. Na avaliação da toxicidade a partir de baixas concentrações, quando comparadas com dados de toxicidade aguda em outras espécies aquáticas, verificou-se que em baixas concentrações de 0,2 $mg L^{-1}$ de trióxido de As, durante 96 h, o tecido retiniano da espécie *Colossoma macropomum*, em especial os neurônios da camada ganglionar são afetados pela presença desse metalóide, o que pode ocasionar importantes alterações na homeostasia neural desta espécie, como a captura de presas, mecanismos de luta e fuga, e bioacumulação hepática do As_2O_3 . Considerando-se os organismos-teste do presente trabalho, a CL_{50} ; 2 h - 0,78 $mg L^{-1}$ do As^{3+} para o protozoário e a $CE(I)_{50}$; 48 h - 0,0006 $mg L^{-1}$ para o

cladóceros, observa-se a tendência esperada da maior resistência nos níveis tróficos superiores, como os peixes.

O pH, a condutividade elétrica e a dureza das soluções teste utilizadas com os cladóceros não variaram significativamente entre o início e o final dos ensaios, sendo que os valores iniciais de pH nas concentrações de As^{3+} variaram entre 5,0 e 8,0 e nas concentrações de As^{5+} entre 3,4 e 8,2; aumentando de forma inversa aos valores das concentrações. Os valores iniciais de condutividade elétrica nas concentrações de As^{3+} variaram entre 3,2 e $118,2 \mu\text{S cm}^{-1}$ e nas concentrações de As^{5+} entre 15,3 e $149,6 \mu\text{S cm}^{-1}$, já os valores de dureza nas concentrações de As^{3+} variaram entre 6 e $54 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ e nas concentrações de As^{5+} entre 8 e $58 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$. Essas variáveis também poderiam estar influenciando os resultados de toxicidade, mas foram de mesma grandeza nas duas formas de As^{3+} e As^{5+} .

A partir dos testes de toxicidade aguda, pelo As e pelas amostras de sedimento, obtidos dos dois organismos-teste utilizados, observa-se de forma clara a maior sensibilidade do cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* em comparação ao protozoário *Paramecium caudatum*. Essa maior resistência do protozoário pode ser explicada pela bioacumulação, que é um importante mecanismo de resistência a metais em microrganismos eucarióticos como protozoários ciliados (MARTÍN-GONZÁLEZ et al., 2006). Essa bioacumulação e resistência a metais nos ciliados ocorrem pela presença da metalotioneína (MT) em suas células. A metalotioneína é uma proteína da família das cisteínas, de baixo peso molecular. Ela tem a capacidade de se ligar tanto fisiológica (com o zinco, cobre, selênio) como xenobioticamente com metais tóxicos (com o cádmio, mercúrio, prata, arsênio), através do grupo tiol de seus resíduos de cisteína, o que representa quase 30% dos seus resíduos de aminoácidos. Em consequência dessas propriedades, Martín-González et al. (2006) sugeriram a utilização destes microrganismos eucarióticos como potenciais biosensores celulares ou moleculares para avaliar a poluição metálica nos ambientes. Por causa da resistência e bioacumulação de alguns metais (cádmio, níquel, zinco, chumbo, cromo, cobre), verificada para alguns protozoários isolados de sistemas de tratamento de esgoto contaminados, a utilização desses protozoários em biorremediação também tem sido considerada (SHAKOORI et al., 2004; REHMAN et al., 2006a, 2006b;

REHMAN et al., 2009; SHUJA & SHAKOORI, 2009). A possível resistência dos protozoários ao As, evidenciada pelos resultados do presente trabalho, mostra que esse organismo talvez não seja adequado para ser utilizado como bioindicador e sim como biorremediador de ambientes contaminados. Embora vários trabalhos publicados mostrem várias espécies de ciliados resistentes a vários metais, nenhum deles relata a resistência ao As especificamente. Isso demonstra a necessidade de maiores estudos com As e *P. caudatum*, bem como outros ciliados.

Outra hipótese para a maior sensibilidade do cladóceros *C. silvestrii* ao As se deve ao modo de ação deste elemento prejudicar organismos mais complexos, ocasionando cardiotoxicidade, neurotoxicidade, além de problemas respiratórios. Já os protozoários são organismos unicelulares, e esta única célula é responsável por todas as funções vitais, não possuindo um sistema cardíaco e neurotóxico específicos que poderiam ser afetados diretamente pelo As.

5.5. Determinação da concentração de As total nos protozoários e cladóceros

5.5.1. Determinação dos teores totais de arsênio na água de cultivo, no sobrenadante do sedimento e nos organismos-teste

Na determinação dos teores totais de As nos protozoários utilizou-se uma curva analítica de calibração, com soluções contendo 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 e 10,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de As, obtendo-se um coeficiente de correlação linear de 0,9943 (Fig. 31).

Já na determinação dos teores totais de As nos cladóceros foram utilizadas duas curvas analíticas de calibração. Para as amostras que apresentavam menores teores de As, preparou-se soluções analíticas de calibração contendo 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0 e 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de As, obtendo-se um coeficiente de correlação linear de 0,9896 (Fig. 32). Para as amostras contendo maiores teores de As, preparou-se soluções analíticas de calibração contendo 5; 10; 20; 30 e 40 $\mu\text{g L}^{-1}$, obtendo-se um coeficiente de correlação linear de 0,9999 (Fig. 33). Todas as soluções analíticas de calibração foram preparadas em meio 0,014 mol L^{-1} HNO_3 .

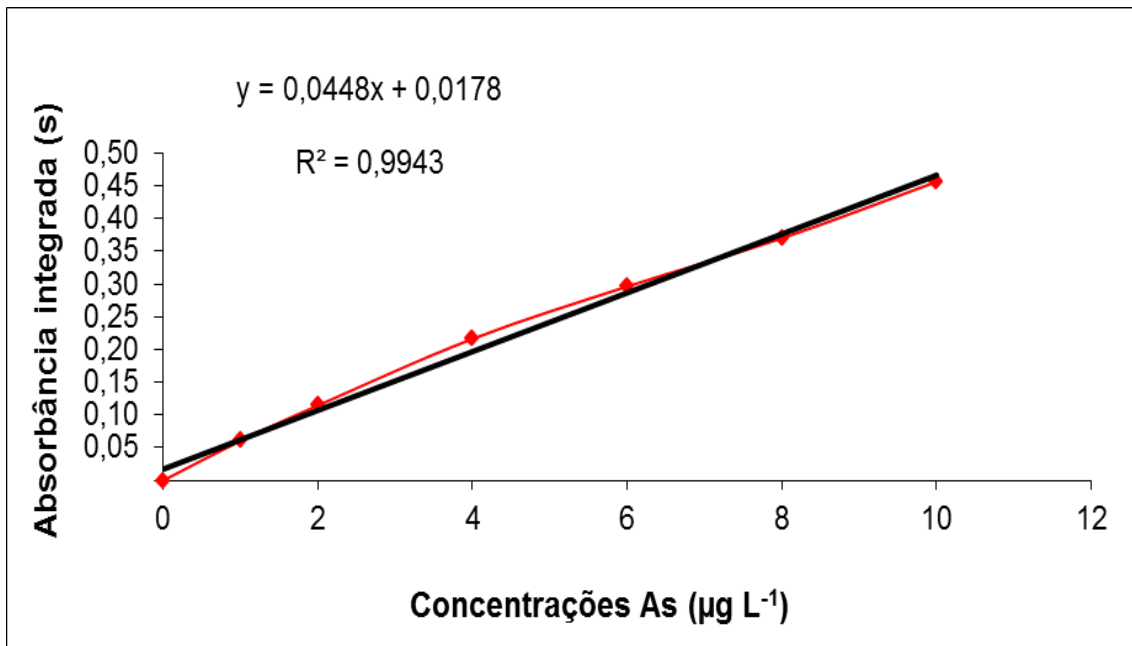


Figura 31. Curva analítica de calibração para protozoários, construída com soluções padrão de 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 e 10,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ As, em meio de 0,014 mol L^{-1} HNO_3

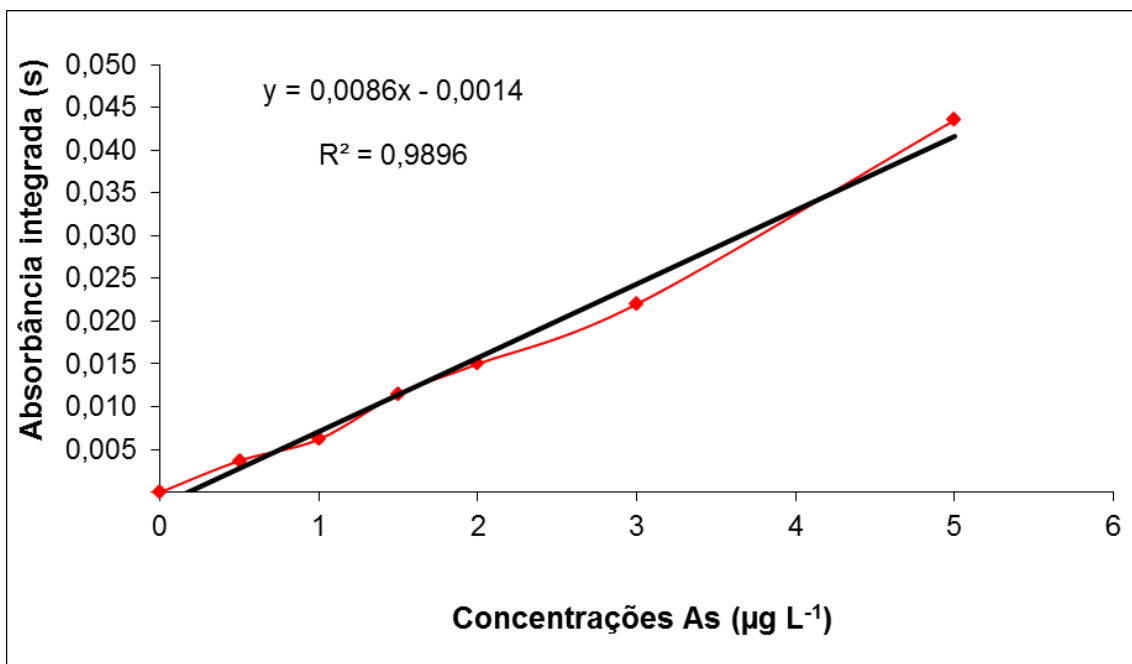


Figura 32. Curva analítica de calibração para cladóceros, construída com soluções padrão de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0 e 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ As, em meio de 0,014 mol L^{-1} HNO_3

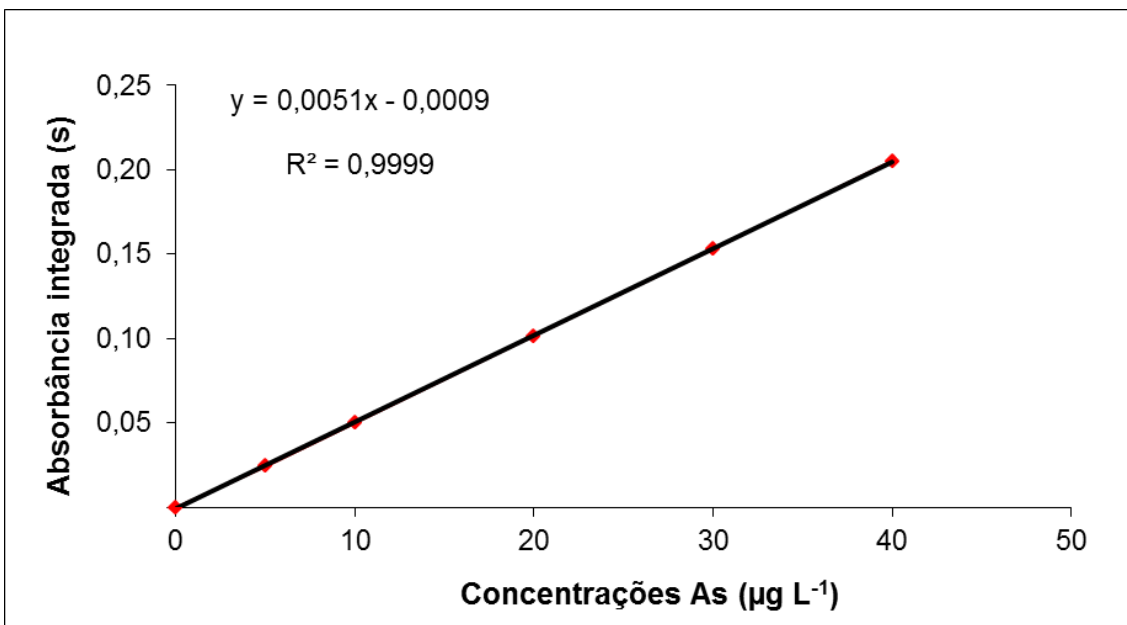


Figura 33. Curva analítica de calibração para cladóceros, construída com soluções padrão de 5; 10; 20; 30 e 40 µg L⁻¹ As, em meio de 0,014 mol L⁻¹ HNO₃

5.5.2. Determinação da concentração de As total no protozoário *Paramecium caudatum*

Os teores determinados de As³⁺ e As⁵⁺ bioacumulados para o protozoário *P. caudatum* estão apresentados nas Tabelas 24 a 26.

Na Tabela 24, observa-se que houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as concentrações de As, em pg x indivíduo As ou µg x g⁻¹ dw As com relação às concentrações dos testes de bioacumulação. Observa-se um aumento do acúmulo de As nos protozoários, proporcional ao aumento das concentrações, estabilizando-se até atingir um limiar. Todavia, para a última concentração dos testes, na qual houve mortalidade de 100% dos indivíduos, houve uma tendência de declínio do teor de As nos indivíduos. Isto pode ser relacionado à ruptura da membrana do protozoário ao morrer, o que levaria à liberação para o meio do elemento, que outrora havia sido acumulado pelo organismo.

Na penúltima concentração utilizada no experimento realizado com a lavagem por EDTA (Tabelas 25 e 26), observa-se a maior concentração de As absorvido que o adsorvido, sendo esta concentração maior nos organismos

vivos do que nos mortos ($p < 0,05$), corroborando com a hipótese da ruptura da membrana do organismo e a liberação do As para o meio.

Tabela 24. Teores totais de As bioacumulados, em μg x indivíduo As ou μg x g^{-1} dw As nos protozoários submetidos a diferentes concentrações de As^{3+} e As^{5+} . *média \pm desvio padrão, $n = 3$ réplicas; LOD = limite de detecção; dw = peso seco

Concentrações ($\text{mg L}^{-1} \text{As}^{3+}$)	As^{3+} (μg x indivíduo As^{3+} / μg x g^{-1} dw As^{3+})	Concentrações ($\text{mg L}^{-1} \text{As}^{5+}$)	As^{5+} (μg x indivíduo As^{5+} / μg x g^{-1} dw As^{5+})
0,0	< 8,0 / < 2,0 (LOD)	0,0	< 8,0 / < 2,0 (LOD)
0,6	35,6 \pm 2,5 / 11,9 \pm 1,0	2,0	203,0 \pm 3,3 / 50,8 \pm 2,4
0,65	45,0 \pm 1,5 / 13,3 \pm 1,1	2,25	224,8 \pm 2,4 / 56,2 \pm 3,1
0,7	60,0 \pm 3,2 / 15,0 \pm 1,3	2,5	275,0 \pm 3,4 / 68,8 \pm 1,8
0,75	70,0 \pm 2,2 / 17,5 \pm 1,2	2,75	282,6 \pm 1,7 / 70,7 \pm 2,8
0,8	29,8 \pm 1,0 / 10,5 \pm 1,0	3,0	183,0 \pm 2,5 / 45,8 \pm 2,5

Tabela 25. Teores totais absorvidos e adsorvidos, em μg x indivíduo As^{3+} ou μg x g^{-1} dw As^{3+} da penúltima concentração de As^{3+} em protozoários vivos e mortos. *média \pm desvio padrão, $n = 3$ réplicas; LOD = limite de detecção; dw = peso seco

Concentrações ($\text{mg L}^{-1} \text{As}^{3+}$)	As^{3+} Absorvido (μg x indivíduo As^{3+} / μg x g^{-1} dw As^{3+})	As^{3+} Adsorvido (μg x indivíduo As^{3+} / μg x g^{-1} dw As^{3+})
0,0	< 8,0 / < 2,0 (LOD)	< 8,0 / < 2,0 (LOD)
0,75 (Vivos)	52,3 \pm 3,7 / 23,1 \pm 2,7	38,5 \pm 2,1 / 14,3 \pm 2,0
0,75 (Mortos)	34,3 \pm 4,2 / 13,1 \pm 1,5	32,2 \pm 1,8 / 10,5 \pm 1,5

Tabela 26. Teores totais absorvidos e adsorvidos, em pg x indivíduo As^{5+} ou $\mu g \times g^{-1}$ dw As^{5+} da penúltima concentração de As^{5+} em protozoários vivos e mortos. *média \pm desvio padrão, n = 3 réplicas; LOD = limite de detecção; dw = peso seco

Concentrações ($mg L^{-1} As^{5+}$)	As^{5+} Absorvido (pg x indivíduo As^{5+} / $\mu g \times g^{-1}$ dw As^{5+})	As^{5+} Adsorvido (pg x indivíduo As^{5+} / $\mu g \times g^{-1}$ dw As^{5+})
0,0	< 8,0 / < 2,0 (LOD)	< 8,0 / < 2,0 (LOD)
2,75 (Vivos)	175,4 \pm 2,7 / 43,9 \pm 3,2	78,6 \pm 1,5 / 19,7 \pm 2,6
2,75 (Mortos)	113,8 \pm 3,4 / 28,5 \pm 1,6	32,3 \pm 1,0 / 10,8 \pm 1,5

Comparando-se os valores totais de As bioacumulados, absorvidos e adsorvidos do As^{3+} e do As^{5+} no protozoário *P. caudatum*, confirma-se a maior toxicidade do primeiro em relação ao segundo, visto que as concentrações acumuladas da forma oxidada foram maiores, da ordem de 5 vezes em relação à forma reduzida. Não foram encontrados trabalhos relacionados à acumulação de As por protozoários, especialmente considerando-se suas diferentes formas inorgânicas.

Alguns trabalhos com protozoários foram encontrados com outros metais, como no trabalho de Nogueira (2007), no qual foi verificada uma maior acumulação de cobre em *P. caudatum* (da ordem de 1.000 vezes) em comparação com a que foi encontrada no presente trabalho para o As; no entanto, o cobre é um metal essencial e é encontrado naturalmente em concentrações muito mais elevadas.

O comportamento do chumbo e cádmio em uma comunidade de protozoários foi estudada por Fernandez-Leborans e Herrero (2000), a fim de se obter dados sobre a toxicidade e bioacumulação destes metais tóxicos. Observou-se que os protozoários bioacumularam valores entre 7,03 a 207,00 $\mu g \times g^{-1}$ dw Pb e valores entre 0,05 a 332,75 $\mu g \times g^{-1}$ dw Cd, representando uma capacidade de acumulação de até 161,45 $\mu g \times g^{-1}$ dw Pb e 310,75 $\mu g \times g^{-1}$ dw Cd, valores muito acima dos encontrados com o As. Isto demonstra a elevada toxicidade do elemento em estudo, mesmo comparados a outros metais tóxicos.

5.5.3. Determinação da concentração de As total no cladócero *Ceriodaphnia silvestrii*

Os teores determinados de As^{3+} e As^{5+} bioacumulados para o cladócero *C. silvestrii* estão apresentados nas Tabelas 27 a 29.

Na Tabela 27, observa-se que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as concentrações de As, em $pg \times$ indivíduo As ou $\mu g \times g^{-1} dw$ As com relação às concentrações dos testes de bioacumulação. Possivelmente, estes organismos possuem um limite máximo de acumulação de substâncias enquanto vivos, independente da concentração do meio externo. Todavia, para a última concentração dos testes, na qual houve mortalidade de 100% dos indivíduos, houve uma tendência de declínio do teor de As nos indivíduos, semelhante ao ocorrido com o protozoário. Nos cladóceros, também ocorre a ruptura da carapaça quando estes morrem.

Na penúltima concentração utilizada no experimento realizado com a lavagem por EDTA (Tabelas 28 e 29), observa-se a maior concentração de As absorvido que o adsorvido, sendo esta concentração maior nos organismos vivos do que nos mortos ($p < 0,05$), corroborando com a hipótese da ruptura da carapaça do organismo e perda do As como no protozoário.

Tabela 27. Teores totais de As bioacumulados, em $pg \times$ indivíduo As ou $\mu g \times g^{-1} dw$ As nos cladóceros submetidos a diferentes concentrações de As^{3+} e As^{5+} . *média \pm desvio padrão, $n = 3$ réplicas; LOD = limite de detecção; dw = peso seco

Concentrações ($mg L^{-1} As^{3+}$)	As^{3+}	Concentrações ($mg L^{-1} As^{5+}$)	As^{5+}
	($pg \times$ indivíduo As^{3+} / $\mu g \times g^{-1} dw As^{3+}$)		($pg \times$ indivíduo As^{5+} / $\mu g \times g^{-1} dw As^{5+}$)
0,0	< 21,1 / < 6,0 (LOD)	0,0	< 21,1 / < 6,0 (LOD)
0,000001	97,9 \pm 13,6 / 28,9 \pm 8,0	0,005	1.606,5 \pm 11,5 / 474,4 \pm 12,4
0,00001	120,9 \pm 17,3 / 35,7 \pm 9,1	0,01	1.609,6 \pm 15,6 / 475,3 \pm 8,6
0,0001	133,4 \pm 12,2 / 39,4 \pm 8,6	0,05	1.617,0 \pm 16,3 / 477,5 \pm 8,8
0,001	143,6 \pm 14,9 / 42,4 \pm 9,4	0,1	1.627,5 \pm 21,7 / 480,6 \pm 9,4
0,01	149,3 \pm 17,9 / 44,1 \pm 9,3	0,5	1.630,2 \pm 19,0 / 481,4 \pm 10,6
0,1	75,9 \pm 11,5 / 22,4 \pm 8,4	1,0	1.575,4 \pm 11,2 / 465,2 \pm 9,7

Tabela 28. Teores totais absorvidos e adsorvidos, em pg x indivíduo As^{3+} ou $\mu g \times g^{-1}$ dw As^{3+} da penúltima concentração de As^{3+} em cladóceros vivos e mortos. *média \pm desvio padrão, n = 3 réplicas; LOD = limite de detecção; dw = peso seco

Concentrações ($mg L^{-1} As^{3+}$)	As^{3+} Absorvido (pg x indivíduo As^{3+} / $\mu g \times g^{-1}$ dw As^{3+})	As^{3+} Adsorvido (pg x indivíduo As^{3+} / $\mu g \times g^{-1}$ dw As^{3+})
0,0	< 21,1 / < 6,0 (LOD)	< 21,1 / < 6,0 (LOD)
0,01 (Vivos)	< 21,1 / < 6,0 (LOD)	< 21,1 / < 6,0 (LOD)
0,01 (Mortos)	< 21,1 / < 6,0 (LOD)	< 21,1 / < 6,0 (LOD)

Tabela 29. Teores totais absorvidos e adsorvidos, em pg x indivíduo As^{5+} ou $\mu g \times g^{-1}$ dw As^{5+} da penúltima concentração de As^{5+} em cladóceros vivos e mortos. *média \pm desvio padrão, n = 3 réplicas; LOD = limite de detecção; dw = peso seco

Concentrações ($mg L^{-1} As^{5+}$)	As^{5+} Absorvido (pg x indivíduo As^{5+} / $\mu g \times g^{-1}$ dw As^{5+})	As^{5+} Adsorvido (pg x indivíduo As^{5+} / $\mu g \times g^{-1}$ dw As^{5+})
0,0	< 21,1 / < 6,0 (LOD)	< 21,1 / < 6,0 (LOD)
0,5 (Vivos)	1.050,2 \pm 8,4 / 392,1 \pm 13,4	420,1 \pm 12,4 / 235,2 \pm 9,6
0,5 (Mortos)	976,5 \pm 10,4 / 360,2 \pm 9,2	230,7 \pm 10,7 / 102,8 \pm 8,7

À semelhança dos resultados obtidos para *P. caudatum*, constata-se que o As^{3+} é também mais tóxico do que o As^{5+} para *C. silvestrii*. As concentrações de As^{5+} acumuladas foram cerca de 15 vezes maiores do que as de As^{3+} . Em relação à literatura, apenas um trabalho foi encontrado relacionado à bioacumulação de As em uma população de *Daphnia laevis* do Reservatório da Pampulha, em Belo Horizonte (PINTO-COELHO et al., 2003). Os valores máximos encontrados na biomassa desta população foram de $2 mg kg^{-1}$, valor bem abaixo da acumulação encontrada em *C. silvestrii* exposta às concentrações mais baixas de As, o que pode indicar uma baixa contaminação por este elemento neste reservatório.

No entanto, alguns trabalhos relacionados à toxicidade de As em outros organismos foram encontrados, permitindo ter uma idéia comparativa da toxicidade deste elemento em relação a outros níveis tróficos.

No trabalho de Carmo et al. (2004) foi avaliada a relação entre a contaminação dos sedimentos e o acúmulo de metais em caranguejos da espécie *Ucides cordatus*, provenientes de dois bosques de mangue situados em Itanhaém: um junto ao Rio do Poço, próximo de um lixão e outro junto ao Rio Itanhaém. Os caranguejos coletados nos dois sítios apresentaram altos teores de As em seus tecidos, chegando a 259 mg g^{-1} , valores da ordem de 1.000 vezes os dos organismos no presente estudo.

No trabalho de Melo et al. (1999) foi determinado o teor de As total em polpas e filés de espécies de peixes de água doce, procedentes do Centro de Pesquisa e Treinamento em Aquicultura, em Pirassununga, São Paulo. Os teores obtidos de As ($\mu\text{g kg}^{-1}$) para os filés e polpas foram, respectivamente: pacu (49 e 8), matrinxã (27 e 24), carpa (66 e 209), tilápia (37 e 277), curimatã (30 e 93), tambaqui (42 e 24) e bagre (43). Em todas as amostras foram encontrados níveis de As inferiores aos recomendados pela legislação brasileira e todos os valores se encontraram abaixo dos encontrados nos cladóceros e protozoários.

Nos experimentos realizados, tanto com os protozoários como com os cladóceros, a concentração de As total dissolvido não foi significativamente diferente entre o início e o final dos testes ($p > 0,05$).

Em alguns casos, não foi possível a quantificação do As absorvido e/ou adsorvido, pois a concentração se encontrava abaixo do limite de detecção da técnica utilizada ou os organismos morreram antes que acumulassem uma quantidade significativa do elemento, devido ao diminuto tamanho destes e das baixas concentrações utilizadas. Mesmo estes organismos-teste possuindo pequeno tamanho, os mesmos são capazes de associar-se ao As e outros metais, exercendo desse modo significativo papel ambiental em relação à disponibilização de metais na cadeia trófica.

6. CONCLUSÕES

- Foram verificadas concentrações elevadas de As total em amostras de sedimento do Ribeirão Guamium coletadas tanto na estação seca (30,46 mg kg⁻¹), quanto na estação chuvosa (36,7 mg kg⁻¹), sobretudo na região à montante (Pontos da Nascente e do Bairro de Tanquinho) e intermediária (Ponto do Disque Animais) da bacia.

- Através dos métodos de especiação química empregados, observou-se que a relação As³⁺/As⁵⁺ variou com o ponto de coleta das amostras.

- Os resultados obtidos com a análise do sedimento foram semelhantes aos valores teóricos previstos para estas amostras, utilizando o diagrama de estabilidade pH x Eh, que indicou predominância da forma As⁵⁺.

- O método de determinação de As total mostrou precisão analítica (22,80 ±0,7 µg g⁻¹) quando comparado ao Material de Referência Certificado WQB-1 (23,00 ±1,84 µg g⁻¹), o qual à semelhança das amostras, apresentou em seu conteúdo total, diferentes frações de As na sua forma inorgânica.

- Embora não seja possível afirmar ser um método analítico quantitativo para as espécies inorgânicas de As, o fracionamento destas formas no CRM WQB-1 é um indicativo da resolução existente nos processos de digestão e/ou extração química de As nos sedimentos.

- A toxicidade do sedimento para o cladócero *Ceriodaphnia silvestrii* e o protozoário *Paramecium caudatum* foi maior nas amostras que apresentaram as maiores concentrações de As total (4,33; 9,8; 30,46 e 36,7 mg kg⁻¹).

- A concordância dos resultados de toxicidade obtidos para os organismos e os valores determinados para as espécies inorgânicas de arsênio nas amostras de sedimento mostram que esses procedimentos químicos empregados e os organismos-teste utilizados são seguros como indicadores da qualidade de sedimentos.

- Na análise química das amostras de sedimento da estação chuvosa, observou-se que, significativa fração do As total encontra-se biodisponível (60%), com prevalência para a forma As³⁺.

- De modo geral, a contaminação por As ao longo dos pontos foi devido ao uso de herbicidas, que possuem As^{5+} como princípio ativo ($\text{CH}_4\text{AsO}_3\text{Na}$) nas plantações de cana-de-açúcar, sendo esta a fonte mais provável deste semi-metal encontrado no ambiente, caracterizando-se como uma fonte dispersiva e não pontual de poluentes.

- Com relação à toxicidade das amostras de sedimento nos organismos-teste, *Ceriodaphnia silvestrii* apresentou sensibilidade aguda significativa em alguns pontos, especialmente àqueles mais tóxicos determinados pelas análises químicas, sendo *Paramecium caudatum* mais resistente, não apresentando sensibilidade significativa em nenhum dos pontos.

- Nos testes de toxicidade aguda com as soluções de As inorgânico, a toxicidade do As^{3+} foi 3 vezes maior do que a toxicidade do As^{5+} para *P. caudatum* ($0,78 \pm 0,0149 \text{ mg L}^{-1} \text{As}^{3+} / 2,55 \pm 0,0116 \text{ mg L}^{-1} \text{As}^{5+}$) e 130 vezes maior para *C. silvestrii* ($0,0006 \pm 0,0003 \text{ mg L}^{-1} \text{As}^{3+} / 0,078 \pm 0,0148 \text{ mg L}^{-1} \text{As}^{5+}$).

- Com exceção da sensibilidade encontrada para o cladóceros *C. silvestrii* ao As^{3+} , o valor máximo permissível de As total ($0,01 \text{ mg L}^{-1}$), estabelecido pela Resolução do CONAMA nº 357/2005 para as águas doces das Classes 1 e 2 é adequado para ambos organismos-teste.

- A toxicidade das formas inorgânicas está de acordo com a literatura, pois a forma reduzida (As^{3+}) é significativamente mais tóxica do que a forma oxidada (As^{5+}), sendo o organismo *C. silvestrii* mais sensível ao As e às amostras de sedimento do que o protozoário *P. caudatum*.

- A determinação do teor total de As nos organismos-teste indicou a bioacumulação desse contaminante em concentrações significativas, sendo o acúmulo maior no cladóceros *C. silvestrii* ($149,3 \pm 17,9 \text{ pg x indivíduo As}^{3+}$ ou $44,1 \pm 9,3 \text{ } \mu\text{g x g}^{-1} \text{ dw As}^{3+} / 1.630,2 \pm 19,0 \text{ pg x indivíduo As}^{5+}$ ou $481,4 \pm 10,6 \text{ } \mu\text{g x g}^{-1} \text{ dw As}^{5+}$) do que no protozoário *P. caudatum* ($70,0 \pm 2,2 \text{ pg x indivíduo As}^{3+}$ ou $17,5 \pm 1,2 \text{ } \mu\text{g x g}^{-1} \text{ dw As}^{3+} / 282,6 \pm 1,7 \text{ pg x indivíduo As}^{5+}$ ou $70,7 \pm 2,8 \text{ } \mu\text{g x g}^{-1} \text{ dw As}^{5+}$), evidenciando uma potencial e preocupante fonte de contaminação na cadeia alimentar por serem organismos constituintes dos primeiros níveis tróficos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGEMIAN, H.; CHAU, A. S. Y. Evaluation of extraction techniques for the determination of metals in aquatic sediments. *Analyst*, London, v.101, p.761-767, 1976.

ALBA-TERCEDOR, J. Macroinvertebrados acuáticos y calidad de las aguas de los rios. *IVSIAGA*, Almeria, v.2, p. 203-213, 1996.

ALVES, H. C.; SELEGHIM, M. H. R.; HAYASHI, L. H.; BUENO, B. G.; HISATUGO, K. F.; PIEROZZI, M. Comparação da eficiência de fixadores de protozoários, utilizados em estudos ecológicos de ambientes aquáticos, em função do pH das amostras. Resumo publicado no Anais do 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia, Porto de Galinhas, 2009.

AMANN, R.; LEMMER, H.; WAGNER, M. Monitoring the community structure of wastewater treatment plants: a comparison of old and new techniques. *FEMS Microbiologic Ecology*, v. 25, p. 205-215, 1998.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 12713: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia* spp (Cladocera, Crustacea). Rio de Janeiro: ABNT, 21p, 2004.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 13373: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com *Ceriodaphnia* spp (Crustacea, Cladocera). Rio de Janeiro: ABNT, 12p, 2005.

ATLAS RURAL DE PIRACICABA. 2004. Disponível em: <<http://www.piracicaba.sp.gov.br>>. Acesso em: 13 de junho de 2010.

BAIRD, C. Química Ambiental. Porto Alegre: Bookmam, 2ª ed., 2002.

BARBOUR, M. T.; GERRITSEN, J.; SNYDER, B. J.; STRIBLING, J. B. Rapid Bioassessment Protocols for use in streams and Wadeable Rivers: Periphyton, Benthic Macroinvertebrates and Fish, 2 ed., 1999.

BARRA, C. M.; SANTELLI, R. E.; ABRÃO, J. J.; GUARDIA, M. Especificação de Arsênio. Química Nova, v.23, p. 58-70, 2000.

BEATY, R. D.; KERBER, J. D. Concepts, Instrumentation and Techniques in Atomic Absorption Spectrophotometry. 2 ed. The Perkin Elmer Co.,1993.

BERNARDI, R. de; GIUSSANI, G.; MANCA, M. Cladocera: Predators and prey. Hydrobiologia, v.145, p. 225-243, 1987.

BEVERIDGE, T. J. Role of cellular design in bacteria-metal accumulation and mineralization. Annual Review of Microbiology, Palo Alto, v.43, p.147-171, 1989.

BORBA, R. P.; FIGUEIREDO, B. R.; MATSCHULLAT, J. Geochemical distribution of arsenic in waters, sediments and weathered gold mineralized rocks from Iron Quadrangle, Brazil. Environmental Geology, v.4, p.39-52, 2003a.

BORBA, R. P.; FIGUEIREDO, B. R.; RAWLLINS, B. G.; MATSCHULLAT, J. Arsenic in water and sediment in the Iron Quadrangle, Minas Gerais state, Brasil. Revista Brasileira de Geociências, v.30, n.3, p.554-557, 2000.

BROOKINS, D. G. Eh-pH diagrams for geochemistry. Springer-Verlag, New York. 176p. 1988.

BUFFLE, J.; VITRE, R. R. Chemical and biological regulation of aquatic ecosystems. Lewis Publishers, London, 393p, 1994.

CARMO, C. V.; MARTINS, L. M. P.; ABESSA, D. M. S.; CRESPO, M. L. L. Contaminação química, toxicidade de sedimentos hídricos e acúmulo de metais

em caranguejos de manguezais de Itanhaém. *Mundo Saúde*, v.28, n.4, p.450-455, 2004.

CETESB (COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL) Decisão de Diretoria N° 195-2005-E: de 23 de novembro de 2005. São Paulo:[s.n.], 2005. 4 p.

CHAPPELL, J.; CHISWELL, B.; OLSZOWY, H. Speciation of Arsenic in a Contaminated Soil by Solvent-Extraction. *Talanta*, v.42, n.3, p. 323, 1995.

CHEN, Y. W.; BELZILE, N. High performance liquid chromatography coupled to atomic fluorescence spectrometry for the speciation of the hydride and chemical vapour-forming elements As, Se, Sb and Hg: A critical review. *Anal. Chim. Acta*, v.671, n.1, p.9, 2010.

CHOUERI, R. B. Consumo e influência de exopolissacarídeos de *Anabaena spiroides* (Cyanophyceae) sobre a toxicidade e captura do cobre em *Ceriodaphnia cornuta* (Cladocera, Daphnidae). 2004. 87 p. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2004.

CLESCERL, L. S.; GREENBERG, A. E.; EATON, A. D. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21 ed. American Water Works Association, 1368p, 2005.

COELHO-BOTELHO, M. J. Dinâmica da comunidade zooplanctônica e sua relação com o grau de trofia em reservatório. *Bol CETESB*, 2004.

COLLINS, Y. E.; STOTZKY, G. Heavy metal alter the electrokinetic properties of bacteria, yeast and clay minerals. *Applied and Environmental Microbiology*, New York, v.58, n.5, p.1592-1600, 1992.

CURDS, C. R.; COCKBURN, A.; VANDYKE, J. M. An experimental study of the role of the ciliated protozoa in the activated sludge process. *Wat. Poll. Contr.*, v. 67, p. 312-329, 1968.

DEVESA, V.; VELEZ, D.; MONTORO, R. Effect of thermal treatments on arsenic species contents in food. *Food and Chemical Toxicology*, v.46, n.1, p. 1, 2008.

DIAS, N.; MORTARA, R. A.; LIMA, N. Morphological and physiological changes in *Tetrahymena pyriformis* for the in vitro cytotoxicity assessment of Triton X-100. *Toxicology in Vitro*, v.17, p. 357-366, 2003.

DIN 38 410. Biological - ecological analysis of water. Berlin: Deutsches Institut für Normung. Oct. Part.2. 18 p. 1990.

DIONÍSIO, A. G. G. Determinação de Arsênio em Amostras do Ciclo Produtivo de Frango de Corte por Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite. 2009. 79f. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.

DOUGHTY, M. J. Effect of extracellular pH on motility and K⁺ - induced ciliary reversal in *Paramecium caudatum*. *J. Protozool.*, 33 (2), p. 435-441, 1986.

DOVE, P. M.; RIMSTIDT, J. D. The solubility and stability of scorodite, FeAsO₄.2H₂O. *Am Mineral*, v.70, p. 838-844, 1985.

FATMA/GTZ. Relevância de parâmetros de qualidade das águas aplicados às águas correntes. Parte I: Características gerais, nutrientes, elementos-traço e substâncias nocivas inorgânicas, características biológicas. Fundação do Meio Ambiente de Santa Catarina, Florianópolis. 108 p. 1999.

FERNANDEZ-LEBORANS, G.; HERRERO, YO. Toxicity and bioaccumulation of lead and cadmium in marine protozoan communities. *Ecotoxicol Environ Saf.*, v.47, n.3, p. 266-76, 2000.

FLORENCE, T. M. The speciation of trace elements in waters. *Talanta*, v.29, p.345-364, 1982.

FOISSNER, W.; BERGER, H. A user friendly guide to the ciliates (Protozoa, Ciliophora) commonly used by hydrobiologists as bioindicators in rivers, lakes, and waste waters, with notes on their ecology. *Freshwater Biology*, 35: 375-482, 1996.

FRESCHI, G. P. G.; DAKUZAKU, C. S.; GOMES-NETO, J. A.; MORAES, M. Espectrometria de Absorção Atômica Multielementar Simultânea com Atomização Eletrotérmica em Forno de Grafite - uma Revisão da Técnica e Aplicações. *Eclética Química*, v.25, 2000.

GARCIA, R. Cerca de 60 mil portugueses bebem água com arsénio a mais. 2006. Disponível em: <http://www.publico.clix.pt/Sociedade/cerca-de-60-mil-portugueses-bebem-agua-com-arsenio-a-mais_1244465?all=1>. Acesso em: 7 de agosto de 2010.

GODINHO, M. J. L.; SELEGHIM, M. H. R. Diversidade de protozoários de vida livre: Protozoa. In: Biodiversidade do Estado de São Paulo: Síntese do conhecimento ao final do século XX. *Microorganismos e Vírus*. eds. CANHOS, V. P.; VAZOLLER, R. F., p. 82-91, 1999.

GULLEY, D. D.; BOETTER, A. M.; BERGMAN, H. L. TOXSTAT 3.3. Computer Program. 1991.

HAMILTON, M. A.; RUSSO, R. C.; THURFTON, R. B. Trimmed Spearman-Kärber methods for estimating median lethal concentration in toxicity bioassay. *Environmental Science & Technology*, 11, p. 714-719, 1977.

HAMILTON, S. J.; BUHL, K. J. Safety assessment of selected inorganic elements to fry of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Ecotoxicol Environ Saf.*, v.20, n.3, p.307-324, 1990.

HEYDARNEJAD, M. S. Survival of *Paramecium caudatum* at various pH values and under normoxic and hypoxic conditions. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 11 (3), p. 392-397, 2008.

HUANG, J.; GOLTZ, D.; SMITH, F. A microwave dissolution technique for the determination of arsenic in soils. *Talanta*, v.35, n.11, p. 907, 1988.

HUSAKOVA, L.; CERNOHORSKY, T.; SRAMKOVA, J.; VAVRUSOVA L. Direct determination of arsenic in beer by electrothermal atomic absorption spectrometry with deuterium background correction (D2-ETAAS). *Food Chemistry*, 105, v.1, p. 286, 2007.

INSTITUTO MINEIRO DE GESTÃO DAS ÁGUAS. Monitoramento das águas Superficiais na Bacia do Rio das Velhas em 2003. Belo Horizonte: IGAM, 2004. 161 p.

JARDIM, G. M. Estudos Ecotoxicológicos da Água de Sedimento do Rio Corumbataí/SP. Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo. Piracicaba/SP, 2004.

KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. Trace elements in soils and plants. 3rd ed. Boca Raton: CRC Press, 2001. 413p.

KOROVCHINSKY, N. M. How many species of Cladocera are there? *Hydrobiologia*, Dordrecht, v.321, p.191-204, 1996.

KUREK, E.; CZABAN, J.; BOLLAG, J. M. Sorption of cadmium by microorganisms in competition with others soil constituents. *Applied and Environmental Microbiology*, New York, v.43, n.5, p.1011-1015, 1982.

LEAL, L. O.; FORTEZA, R.; CERDA, V. Speciation analysis of inorganic arsenic by a multisyringe flow injection system with hydride generation-atomic fluorescence spectrometric detection. *Talanta*, v.69, p. 500-508, 2006.

LEERMAKERS, M.; BAEYENS, W.; DE GIETER, M.; SMEDTS, B.; MEERT, C.; DE BISSCHOP, H. C.; MORABITO, R.; QUEVAUVILLER, Ph. Toxic arsenic compounds in environmental samples: Speciation and validation. *Trends Anal. Chem.*, v.25, n.1, p.1, 2006.

LI, X.; JIA, J.; WANG, Z. H. Speciation of inorganic arsenic by electrochemical hydride generation atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, v.560, n.1-2, p. 153, 2006.

LIMA, M. O. Caracterização geoquímica de arsênio total em águas e sedimentos em áreas de rejeitos de minérios de manganês no Município de Santana - Estado do Amapá. 2003. 85f. Dissertação (Mestrado em Geoquímica) - Centro de Geociências, Universidade Federal do Pará, Belém, 2003.

LIU, Z.; SUN, H.; SHEN, S.; LI, L.; SHI, H. Simultaneous of total arsenic and total selenium in Chinese medicinal herbs by hydride generation atomic fluorescence spectrometry in tartaric acid medium. *Analytica Chimica Acta*, v.550, n.1-2, p. 151, 2005.

LOPEZ, A.; TORRIALBA, R.; PALACIOS, M. A.; CAMARA, C. *Talanta*, v. 39, n. 1343, 1992.

LORES, E. M.; SNYDER, R. A.; PENNOCK, J. R. The effect of humic acid on uptake-adsorption of copper by a marine bacterium and two marine ciliates. *Chemosphere*, v. 28, p. 293-310, 1999.

MADONI, P.; DAVOLI, D.; CHIERICI, E. Comparative analysis of the activated sludge microfauna in several sewage treatment works. *War. Res.*, v. 27, p. 1485-1491, 1993.

MADONI, P.; DAVOLI, D.; GORBI, G. Acute toxicity of lead, chromium, and other heavy metals to ciliates from activated sludge plants. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 53, p. 420-425, 1994.

MADONI, P.; DAVOLI, D.; GORBI, G.; VESCOVI, L. Toxic effect of heavy metals on the activated sludge protozoan community. *Water Res.*, v. 30, p. 135-141, 1996.

MADONI, P. Protozoa as indicators of wastewater treatment efficiency. In: MARA, D.; HORAN, N. (Eds.). *The Handbook of Water and Wastewater Microbiology*. Academic Press, Amsterdam, p. 361-371. 2003.

MADONI, P. Protozoa in activated sludge. In: BITTON, G. (Ed.). *Encyclopedia of Environmental Microbiology*. John Wiley & Sons, New York, p. 2605-2612. 2002.

MADONI, P.; ROMEO, M. G. Acute toxicity of heavy metals towards freshwater ciliated protists. *Environmental Pollution*, v.141, p. 1-7, 2006.

MARTÍN-GONZÁLEZ, A.; DÍAZ, S.; BORNIQUEL, S.; GALLEGO, A.; GUTIÉRREZ, J. C. Cytotoxicity and bioaccumulation of heavy metals by ciliated protozoa isolated from urban wastewater treatment plants. *Research in Microbiology*, 157, p. 108-118, 2006.

MELO, L. F. C.; MORGANO, M. A.; MANTOVANI, D. M. B. Avaliação do teor de arsênio total em pescado de água doce. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, v.58, n.2, p. 81-86, 1999.

MIRANDA, M. M. P.; SELEGHIM, M. H. R.; FATIBELLO, O. F.; MELO, B. A. R. Avaliação experimental do efeito tóxico de metais pesados frente ao protozoário ciliado *Paramecium caudatum*. Resumo no II Simpósio de Ecologia do PPGERN, Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 2008.

MIRIMANOFF, N.; WILKINSON, J. Regulation of Zn accumulation by a freshwater gram-positive bacterium (*Rhodococcus opacus*). *Environmental Science and Technology*, v. 3, p. 612-622, 2000.

MOZETO, A. A. Critérios de qualidade de sedimentos (CQS) para metais pesados: Fundamentos teóricos e técnico para implementação. Relatório Científico à FAPESP, 2001.

MUDROCH, A.; AZCUE, J. M. Manual of aquatic sediment sampling. CRC Press, Boca Raton: Flórida, 1995. 219p.

NALECZ-JAWECKI, G.; SAWICKI, J. The toxicity of tri-substituted benzenes to the protozoan ciliate *Spirostomum ambiguum*. Chemosphere, v.46, p. 333-337, 2002.

NALECZ-JAWECKI, G. Spirotox-*Spirostomum ambiguum* Acute Toxicity Test- 10 years of experience. Environmental Toxicology, v.19, p. 359-364, 2004.

NATIONAL WATER RESEARCH INSTITUTE (1994) WQB-1. Trace metals in sediment. Certificate of Analysis. Aquatic Ecosystem Protection Branch, National Water Research Institute, Burlington, Ontario, Canada.

NICHOLS, J. W.; WEDEMEYER, G. A.; MAYER, F. L.; DICKHOFF, W. W.; GREGORY, S. V.; YASUTAKE, W. T.; SMITH, S. D. Effects of freshwater exposure to arsenic trioxide on the parr-smolt transformation of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). Environ Toxicol Chem, 3, p.142-149, 1984.

NICOLAU, A.; MARTINS, M. J.; MOTA, M.; LIMA, N. Estudo da comunidade de protozoários exposta a tóxicos em estações de tratamento de águas residuais, 10p, 1999.

NOGUEIRA, P. F. M. Interação entre a matéria orgânica natural, o cobre e microrganismos heterotróficos: implicações na dinâmica do metal e sua disponibilização para a biota aquática. 2007. 175f. Dissertação (Tese em Ciências), Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 2007.

NOGUEIRA, P. F. M.; MELÃO, M. G. G; LOMBARDI, A. T.; VIEIRA, A. A. H. The effects of *Anabaena spiroides* (Cyanophyceae) exopolysaccharide on copper toxicity to *Simocephalus serrulatus* (Cladocera, Daphnidae). Freshwater Biology, v. 50, p. 1560-1567, 2005.

O'DAY, P. Chemistry and mineralogy of arsenic. Elements, v.2, n.2, p. 77, 2006.

PATRA, M.; BHOWMIKB, N.; BANDOPADHYAY, B.; SHARMA, A. Comparison of Mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the development of genetic tolerance. *Environmental and Experimental Botany*, v.52, p. 199-223, 2004.

PICKERING, W. F. General strategies for speciation. In: URE, A. M. and DAVIDSON, C. M. *Chemical speciation in the environment*. Blackie Academic Professional, Glasgow. 1st edition. p. 9-32. 1995.

PINTO-COELHO, R. M.; BEZERRA-NETO, J. F.; GIANI, A.; MACEDO, C. F.; FIGUEREDO, C. C.; CARVALHO, E. A. The collapse of a *Daphnia laevis* (Birge, 1878) population in Pampulha reservoir, Brazil. *Acta Limnol. Bras.*, v.15, n.3, p. 53-70, 2003.

REHMAN, A.; SHAKOORI, F. R.; SHAKOORI, A. R. Heavy metal resistant ciliate, *Euplotes mutabilis*, isolated from industrial effluents can decontaminate wastewater of heavy metals. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, v.76, n.6, p.907-13, 2006a.

REHMAN, A.; SHAKOORI, F. R.; SHAKOORI, A. R. Heavy metal uptake by *Euplotes mutabilis* and its possible use in bioremediation of industrial wastewater. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, v.83, n.1, p.130-135, 2009.

REHMAN, A.; SHAKOORI, F. R.; SHAKOORI, A. R. Uptake of heavy metals by a ciliate, *Tachysoma pellionella*, isolated from industrial effluents and its potential use in bioremediation of toxic wastewater. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, v.77, n.3, p.469-76, 2006b.

RESOLUÇÃO CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente) N^o. 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. *Diário Oficial da União, Brasília, DF*, 18 de março de 2005.

RODRIGUES, R. Poluição da Água pelo Arsênio. 2010. Dissertação (Mestrado), Unidade Curricular de Poluição e Recursos, 2010.

ROSIU, C. J.; GIESY, J. P.; KREIS JR, R. G. Toxicity of vertical sediments in the Trenton Channel, Detroit River, Michigan, to *Chironomus tentans* (Insecta: Chironomidae). J. Great Lakes Res., v.15, n.4, p.570-580, 1989.

SALAUN, P.; PLANER-FRIEDERICH, B.; VAN DEN BER, C. M. G. Inorganic arsenic speciation in water and seawater by anodic stripping voltametry with a gold microelectrode. Analytica Chimica Acta, v. 585, 312-322, 2007.

SALVADO', H.; GRACIA, M. P.; AMIGO', J. M. Capability of ciliated protozoa as indicators of effluent quality in activated sludge plants. Water Res., v. 29, p. 1041-1050, 1995.

SANTOS, G. A. dos. Crescimento e respostas antioxidantes de macrófitas aquáticas submetidas ao arsênio. 2006. 45f. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

SANTOS, L. M. G. dos; JACOB, S. C. do. Avaliação do risco por ingestão de arsênio presente em produtos da cesta básica dos brasileiros. Hig. aliment., n.19, v.137, p. 166-172, 2005.

SANTOS, M. A. P. F. Influências de substâncias húmicas nas características bionômicas, toxicidade e bioacumulação de cobre por *Ceriodaphnia silvestrii* Daday (Crustacea, Cladocera). 2004. 118 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2004.

SECRETARIA DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA. Disponível em: <<http://www.desenvolvimento.sp.gov.br/noticias/?ID=195>>. Acesso em: 20 de julho de 2010.

SERAFIMOVSKI, I.; KARADJOVA, I. B.; STAFILOV, T.; TSALEV, D. L. Determination of total arsenic and toxicologically relevant arsenic species in fish by using electrothermal and hydride generation atomic absorption spectrometry. *Microchemical Journal*, v.83, n.2, p. 55, 2006.

SHAKOORI, A. R.; REHMAN, A.; RIAZ-UI-HAQ. Multiple metal resistance in the ciliate protozoan, *Vorticella microstoma*, isolated from industrial effluents and its potential in bioremediation of toxic wastes. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, v.72, n.5, p.1046-51, 2004.

SHOKOHIFARD, G.; HAMADA, R.; SAKAGAMI, K. Ion-(Na)-holding capacity of microbial biomass under saline conditions. *Soil Biology and Biochemistry*, Elmsford, v.22, n.7, p.993-994, 1990.

SHUJA, R. N.; SHAKOORI, A. R. Identification and cloning of first cadmium metallothionein like gene from locally isolated ciliate, *Paramecium* sp. *Molecular Biology Reports*, v.36, n.3, p.549-560, 2009.

SIQUEIRA, G. W.; LIMA, W. N. de; MENDES, A. S.; APRILE, F. M.; BRAGA, E. de S.; MAHIQUES, M. M. de Evolução do impacto ambiental causado por matéria orgânica, mercúrio e arsênio nos sedimentos de fundo do Sistema Estuarino de Santos. *Geochim. Brasil*, v.18, n.1, p.54-63, 2004.

SOARES, P. F. Projeto e análise de desempenho de redes de monitoramento da qualidade da água. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2003. 154 f.

SPOSITO, G; LUND, L. J.; CHANG, A. C. Trace metal chemistry in arid zone field soils amended with sewage sludge: fractionation of Ni, Cu, Zn, Cd and Pb in solid phases. *Soil Science Society America Journal*, v.46, p.260-264, 1982.

TOUJAGUE, R. R. Arsênio e metais associados na região Aurífera do Piririca, Vale do Ribeira, São Paulo, Brasil. 1999. 56f. Dissertação (Mestrado em

Geociências) - Instituto de Geociências, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999.

TURLEY, C. M.; LOCHTE, K.; PATTERSON, D. J. A barophilic flagellate isolated from 4.500m in mid-North Atlantic. *Deep Sea Research*, v.35, p. 1079-1092, 1988.

USEPA. Ambient aquatic life water quality criteria for chromium. Cincinnati, Ohio, 1984. 107p.

USEPA. Elements of biomonitoring. In: UNITED STATES. Revision to rapid bio assessment protocols for use in streams and rivers: periphyton, benthic macroinvertebrates and fish. Washington: USEPA. Cap. 3, 1- 11 p. 1996.

USEPA. USEPA/600/R-94/024. Methodos for mensuring the toxicity and bioacumulation os sediment associated contaminants with freshwater invertebrates. Washington, D. C., 133p. 1994.

USEPA. USEPA/600/4-85/014. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms. Cincinnati, Ohio, p. 162, 1985.

VAN LOON, J. C.; BAREFOOT, R. R. Overview of analytical methods for elemental speciation. *Analyst*, 117, 563, 1992.

VENKATESWARA, R. J.; SRIKANTH, K.; AREPALLI, S. K.; GUNDA, V. G. Toxic effects of acephate on *Paramecium caudatum* with special emphasis on morphology, behaviour, and generation time. *J. Pest. Biochem. Physiol.*, 86: 131-137, 2006.

WANICK, R. C.; PAIVA, T. S.; CARVALHO, C. N.; SILVA-NETO, I. D. Acute Toxicity of Cadmium to Freshwater Ciliate *Paramecium bursaria*. *Biociências*, Porto Alegre, v.16, n.2, p. 104-109, 2008.

WELZ, B.; SPERLING, M. Atomic Absorption Spectrometry. 3^a ed. Weinheim, Wiley-VCH, 1999.

WHO. IPCS - Environmental Health Criteria 224. ARSENIC AND ARSENIC COMPOUNDS. Geneva 2001.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações. Editora Rima, São Carlos, SP. 478 p. 2006.