



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CEILÂNDIA
CURSO DE FARMÁCIA**

Isaque Madureira Barbosa

**Análise da qualidade da água do DF em regiões de descarga de estações de
tratamento de esgoto por meio do uso de bioindicadores.**

BRASÍLIA, 2019

Isaque Madureira Barbosa

Análise da qualidade da água do DF em regiões de descarga de estações de tratamento de esgoto por meio do uso de bioindicadores.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para obtenção do grau de Farmacêutico, Faculdade de Ceilândia, Universidade de Brasília.

Orientador (a): Prof(a). Mariana Furio Franco Bernardes

Co-orientador (a): Prof(a). Vivian da Silva Santos

BRASÍLIA, 2019

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

BB238a Barbosa, Isaque Madureira
Análise da qualidade da água do DF em regiões de
descarga de estações de tratamento de esgoto por meio do uso
de bioindicadores. / Isaque Madureira Barbosa; orientador
Mariana Furio Franco Bernardes; co-orientador Vivian da
Silva Santos. -- Brasília, 2019.
63 p.

Monografia (Graduação - Farmácia) -- Universidade de
Brasília, 2019.

1. Toxicologia ambiental. 2. Toxicologia aquática. 3.
Análise da qualidade da água em regiões de descargas de
Estações de Tratamento de Esgoto. 4. Danio rerio. 5. Allium
cepa. I. Furio Franco Bernardes, Mariana, orient. II. da
Silva Santos, Vivian, co-orient. III. Título.

Isaque Madureira Barbosa

Análise da qualidade da água do DF em regiões de descarga de estações de tratamento de esgoto por meio do uso de bioindicadores.

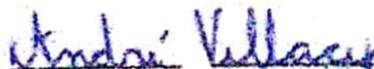
BANCA EXAMINADORA



Orientador(a): Prof. Dra. Mariana Furio Franco Bernardes
Faculdade de Ceilândia – Universidade de Brasília – UnB



Prof. Dr. César Koppe Grisólia
Universidade de Brasília – UnB



Prof. Dr. Rolando André Rios Villacis
Universidade de Brasília – UnB

BRASÍLIA, 2019

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, meu primeiro amor, refúgio e fortaleza, socorro bem presente na angústia, portanto não temerei, ainda que a terra se mude e ainda que os montes se transportem para o meio dos mares.

A minha mãe Carla, por ser um porto seguro em minha vida, sempre dando condições para o meu estudo e aperfeiçoamento profissional, demonstrando um amor incondicional.

As minhas irmãs, Júlia e Laura, por todo companheirismo, brincadeiras e amor, que sempre me ajudam a ver a vida através de uma ótica mais leve e alegre.

A minha esposa Caroline Luísa, agradeço por estar ao meu lado durante a graduação, nos momentos de dificuldade, obrigado por escolher me amar, sendo uma ótima conselheira, sempre acreditando no meu potencial.

Aos meus tios, Paulo e Cláudia, tenho-vos como pai e mãe, por todo auxílio em minha criação, sempre dispostos a me receber com o maior amor do mundo, o meu muito obrigado.

Ao meu primo João Paulo, o irmão que eu não tive, muito obrigado por todas as experiências que partilhamos durante nossa criação, por todas as brincadeiras e tudo que aprendemos juntos. As minhas primas, Isabelle e Raíssa, pelas experiências juntos.

Ao meu pai Newton, por se esforçar em sempre me dar uma boa educação, abrindo diversas portas para o meu futuro.

Aos meus tios, Carlos José, André, João e Nilde, por auxiliarem na minha criação. Ao meu falecido avô Manoel, pilar e fundador da minha família, exemplo de homem, obrigado por seus esforços que possibilitaram a evolução de nossa família.

Ao meu amigo Rodrigo, obrigado por ser a parte descontraída e espontânea da minha vida, obrigado por sua amizade sincera e lealdade. Ao meu amigo Matheus, agradeço por sempre estar disposto a me ajudar, inclusive na confecção de alguns aspectos deste trabalho, obrigado por ser um amigo fiel, tornando a minha vida mais feliz.

Aos meus irmãos de graduação, Gabriel, Kamila, Carolline, Daniel, Iago, Higino, Felipe e Ícaro, obrigado por serem a melhor parte da minha experiência acadêmica, sem sombra de dúvidas a minha caminhada teria sido muito mais árdua

sem vocês, obrigado por dividirem comigo as lutas e as vitórias.

Aos meus amigos, Antônio Paulo, Thiago, Daniel, Matheus e Francisco, obrigado por todos os anos de amizade, risadas e momentos que passamos juntos.

A minha querida amiga Maria Luiza, que me apresentou o curso de farmácia, me guiando e aconselhando por diversos momentos durante a graduação, o meu muito obrigado.

A minha orientadora Mariana, obrigado pela paciência e boa vontade no ensino, obrigado pela sabedoria que nos levou à conclusão desse projeto.

A Universidade de Brasília, bem como ao seu corpo docente, por todo suporte durante esses anos de graduação, pelas experiências que mudaram minha vida e jamais serão esquecidas. Ao departamento de farmácia da Faculdade da Ceilândia, pelo esforço em entregar o mais alto nível de ensino. Ao Departamento de Genética e Morfologia da Universidade de Brasília, por ceder o espaço para a realização dos experimentos.

A todas as pessoas que fizeram parte da minha evolução pessoal durante o período de graduação, o meu muito obrigado.

Não te mandei Eu? Esforça-te, e tem bom ânimo; não te atemorizes, nem te espantes; porque o Senhor teu Deus está contigo, por onde quer que andares.

Josué 1:9

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	16
<u>2.1 A importância da qualidade da água</u>	16
<u>2.2 Visão histórica da toxicologia aquática</u>	16
<u>2.3 Toxicologia aquática na atualidade.....</u>	17
<u>2.4 Monitoramento de contaminantes.....</u>	19
<u>2.5 Tratamento de efluentes.....</u>	20
<u>2.6 Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs)</u>	21
<u>2.6.1 ETE Alagado.....</u>	24
<u>2.6.2 ETE BSB Norte.....</u>	24
<u>2.6.3 ETE BSB Sul</u>	24
<u>2.6.4 ETE Brazlândia.....</u>	25
<u>2.6.5 ETE Gama</u>	25
<u>2.6.6 ETE Paranoá</u>	25
<u>2.6.7 ETE Planaltina</u>	26
<u>2.6.8 ETE Recanto das Emas</u>	26
<u>2.6.9 ETE Riacho Fundo</u>	26
<u>2.6.10 ETE Samambaia.....</u>	27
<u>2.6.11 ETE São Sebastião</u>	28
<u>2.6.12 ETE Sobradinho</u>	28
<u>2.6.13 ETE Vale do Amanhecer</u>	29
<u>2.7 Bioindicadores</u>	30
<u>2.7.1 <i>Allium cepa</i></u>	30
<u>2.7.2 <i>Danio rerio</i> (Peixe-zebra).....</u>	30
3. OBJETIVOS	32
<u>3.1 Objetivo Geral.....</u>	32
<u>3.2 Objetivos específicos.....</u>	32

4. JUSTIFICATIVA	33
5. MÉTODOS	33
<u>5.1</u> Teste de citotoxicidade em <i>Allium cepa</i>	34
<u>5.2</u> Teste de toxicidade aguda em embrião de peixe (FET)	36
<u>5.3</u> Análise Estatística	38
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
7. CONCLUSÃO	55
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
9. ANEXOS	63

RESUMO

Por ser um dos elementos indispensáveis para o surgimento e equilíbrio da vida na Terra, a qualidade da água necessita ser monitorada. A Companhia de Saneamento Ambiental do Distrito Federal (CAESB), conta com 15 Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs), que removem os poluentes do esgoto sanitário da capital. Apesar do aparato destinado ao tratamento de efluentes, por vezes a água que chega à população pode apresentar riscos à saúde. Para avaliar determinados parâmetros de qualidade da água, bioindicadores como a *Allium cepa* e o *Danio rerio*, podem ser utilizados. O objetivo do presente trabalho foi analisar amostras de água coletadas a montante e a jusante de regiões de descarga de treze ETEs, por meio de bioindicadores. O teste de citotoxicidade em *Allium cepa*, foi baseado em Fiskesjo (1985) e o teste de toxicidade aguda em embrião de peixe-zebra (FET), foi realizado conforme recomendações da OECD nº 236. Os resultados mostraram citotoxicidade aguda através do teste em *Allium cepa* para as ETEs Gama, Recanto das Emas, Samambaia e Vale do Amanhecer. Por meio do FET, foram observados efeitos subletais e letais nos organismos testados referentes as amostras das ETEs Recantos das Emas e São Sebastião. Os dados obtidos fornecem informações valiosas a respeito dos efeitos das amostras de água em organismos vivos, trazendo à tona questões de interesse ambiental, econômico e de saúde pública. Os achados também corroboram para uma possível revisão e renovação dos métodos de tratamento nas ETEs Recanto das Emas e São Sebastião.

Palavras-Chave: Estações de Tratamento de Esgoto, *Allium cepa*, Peixe-zebra, Bioindicadores, Qualidade da água.

ABSTRACT

For being one of the indispensable elements for the emergence and balance of life on Earth, water quality needs to be monitored. The Environmental Sanitation Company of the Federal District (CAESB) has 15 Sewage Treatment Plants (STPs), which remove pollutants from the sanitary sewer of the capital. Although the apparatus for the treatment of effluents, eventually the water which reaches the population can present health risks. In order to evaluate certain water quality parameters, bioindicators such as *Allium cepa* and *Danio rerio* can be used. The objective of the present work was to analyze water samples collected upstream and downstream of discharge regions of thirteen STPs, using bioindicators. The cytotoxicity test in *Allium cepa* was based on Fiskesjo (1985) and the acute zebrafish embryo toxicity test (FET) was performed according to recommendation of OECD nº 236. The results showed acute cytotoxicity by the *Allium cepa* test for the Gama, Recanto das Emas, Samambaia and Vale do Amanhecer STPs. Through FET, we observed sublethal and lethal effects in the tested organisms for the samples of Recantos das Emas and São Sebastião STPs. The obtained data provide valuable information about the effects of the water samples on living organisms, bringing up issues of environmental, economic and public health interest. The findings also corroborate for a possible revision and renewal of the treatment methods in the Recanto das Emas and São Sebastião STPs.

Keywords: Sewage Treatment Stations, *Allium cepa*, Zebrafish, Bioindicators, Water Quality.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSB – Brasília

CN – Controle Negativo

DBO – Demanda Bioquímica de Oxigênio

DF – Distrito Federal

ETE – Estação de Tratamento de Esgoto

FET – Fish Embryo Toxicity

HAPs – Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos

IM – Índice Mitótico

PDSB - Plano Distrital de Saneamento Básico

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa do Distrito Federal, contendo a localização das 13 ETEs avaliadas através de testes com bioindicadores.....	23
Figura 2. Células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> em intérfase e diferentes fases da mitose.....	38
Figura 3. Células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> em diferentes fases da mitose.....	39
Figura 4. Visão geral da porcentagem de mortalidade apresentada por peixes <i>Danio rerio</i> , expostos a amostras coletadas a montante de cada Estação de Tratamento de Esgoto, ao decorrer dos dias de experimento.....	44
Figura 5. Visão geral da porcentagem de mortalidade apresentada por peixes <i>Danio rerio</i> , expostos a amostras coletadas a jusante de cada Estação de Tratamento de Esgoto, ao decorrer dos dias de experimento.....	45
Figura 6. – Porcentagem dos efeitos subletais apresentados por embriões e larvas de peixes-zebra.....	50
Figura 7. Fases primárias de vida de peixes-zebra, expostos ao CN.....	52
Figura 8. Fases primárias de vida de peixes-zebra, expostos a amostras de água coletadas a montante e a jusante da ETE Recanto das Emas.....	53
Figura 9. Fases primárias de vida de peixes-zebra, expostos a amostras de água coletadas a montante e a jusante da ETE São Sebastião.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fases da mitose e índice mitótico observados em células de <i>Allium cepa</i> expostas a amostras coletadas em corpos d'água a montante de Estações de Tratamento de Esgoto.....	40
Tabela 2. Fases da mitose e índice mitótico observados em células de <i>Allium cepa</i> expostas a amostras coletadas em corpos d'água a jusante de Estações de Tratamento de Esgoto.....	40
Tabela 3. ETes cujos valores de P obtiveram diferença estatística significativa ($P < 0,05$) para os testes One Way ANOVA ou Kruskal-Wallis e teste Tukey, durante o teste de citotoxicidade em <i>Allium cepa</i>	42
Tabela 4. Valores de Média e desvio padrão das taxas de mortalidade para amostras coletadas a montante de ETes.....	47
Tabela 5. Valores de Média e desvio padrão das taxas de mortalidade para amostras coletadas a jusante de ETes.....	47
Tabela 6. Valores de P para a média e desvio padrão das taxas de mortalidade para amostras coletadas a jusante de ETes, que obtiveram diferença estatística significativa ($P < 0,05$) durante o teste FET.....	48
Tabela 7. Principais efeitos subletais cujos valores de P obtiveram diferença estatística significativa ($P < 0,05$) para os testes One Way ANOVA ou Kruskal-Wallis e teste Tukey, durante o teste FET, realizado com amostras da ETE (Recanto das Emas).....	51
Tabela 8. Principais efeitos subletais cujos valores de P obtiveram diferença estatística significativa ($P < 0,05$) para os testes One Way ANOVA ou Kruskal-Wallis e teste Tukey, durante o teste FET, realizado com amostras da ETE (São Sebastião).....	51

1. INTRODUÇÃO

A vida como conhecemos, exige uma química altamente delicada, tanto para sua formação, quanto para sua manutenção (BALL, 2001). A água é um dos elementos essenciais para os processos vitais, é o solvente universal que media reações químicas fundamentais, transitando facilmente entre os estados sólido, líquido e gasoso, tornando-se incomum em relação a qualquer outro líquido (BALL, 2001).

Por ser um dos elementos indispensáveis para o surgimento e equilíbrio da vida na Terra (BALL, 2001), a água deve ser preservada, bem como sua qualidade necessita ser monitorada (WHO, 2011). Nesse âmbito, atuam as Companhias de Saneamento Ambiental, que possuem como missão administrar os sistemas de abastecimento de água. Atualmente, a Companhia de Saneamento Ambiental do Distrito Federal (CAESB), conta com 15 Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs), que removem os poluentes do esgoto sanitário da capital, através de processos químicos, físicos e biológicos (CAESB, 2018).

Por não possuir um polo industrial expressivo, a maior parte do tratamento de efluentes do Distrito Federal é feito a nível doméstico, sendo dividido em tratamento preliminar e tratamento primário, secundário e terciário. Nesse sentido:

No tratamento preliminar são utilizadas grades, peneiras ou caixas de areia para reter os resíduos maiores e impedir que haja danos às próximas unidades de tratamento. No tratamento a nível primário são sedimentados os sólidos em suspensão que vão se acumulando no fundo do decantador, formando o lodo primário que depois é retirado para dar continuidade ao processo. Em seguida, no tratamento a nível secundário, os microorganismos irão se alimentar da matéria orgânica, convertendo-a em gás carbônico e água. No tratamento a nível terciário são removidos poluentes específicos como os micronutrientes fósforo e nitrogênio (CAESB, 2018).

No presente momento, o órgão responsável por criar normas e critérios para garantir a qualidade dos efluentes lançados em corpos d'água é o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), que através da RESOLUÇÃO Nº 357/05, dispõe sobre a classificação dos corpos d'água, diretrizes ambientais para o seu enquadramento (CONAMA, 2005) e juntamente com a RESOLUÇÃO Nº 430/11 dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes (CONAMA, 2011).

Apesar de todo o aparato destinado ao tratamento de efluentes, por vezes a

água que chega à população pode representar risco à saúde (METCALFE, 2010). Metais, por exemplo, podem ser encontrados na água mesmo após passarem pelas Estações de Tratamento de Esgoto. Alguns desses metais, como o cobre, manganês e molibdênio, são considerados essenciais, ou seja, necessários aos seres vivos em pequenas quantidades, no entanto, níveis excessivos desses elementos podem ser tóxicos. Metais como o cádmio, chumbo e mercúrio, classificados como metais pesados, possuem potencial acumulativo em alguns organismos vivos, resultando em graves doenças, pode-se ressaltar ainda, que esses elementos não possuem função fisiológica conhecida (RUPPENTHAL, 2013).

Devido a possibilidade da ocorrência de substâncias químicas na água mesmo após tratamento (METCALFE, 2010), a análise da qualidade da água próxima a Estações de Tratamento de Esgoto se mostra de extrema importância, para isso, pode-se fazer uso de bioindicadores. O uso de bioindicadores apresenta-se como uma das principais ferramentas nesse âmbito, especialmente para estudos de citotoxicidade e genotoxicidade.

Os bioindicadores são processos biológicos, espécies ou comunidades, utilizados para avaliar a qualidade do ambiente, bem como a mudança temporal que o mesmo pode sofrer, sendo ela de caráter antropogênico ou natural (HOLT, 2010).

Um bioindicador que vem sendo usado amplamente para testes de toxicidade, citotoxicidade e mutagenicidade desde os anos 30 é a *Allium cepa*, popularmente conhecida como cebola. Essa planta tem sido uma das principais escolhas para tais testes devido à resposta causada por agentes tóxicos em seu material genético e pelo crescimento veloz de suas raízes (LONGHIN, 2008). Outras vantagens desse bioindicador compreendem o simples armazenamento, o baixo custo, a fácil manipulação e a rápida conclusão do ensaio (FISKESJO, 1985).

Outro bioindicador que vem ganhando destaque no campo científico por sua versatilidade e praticidade é o peixe-zebra (*Danio rerio*), popularmente conhecido como paulistinha, bandeirinha e bandeira-paulista. A comparação entre o genoma humano e o genoma do peixe-zebra, mostrou que cerca de 70% dos genes humanos teriam ao menos um ortólogo no genoma do peixe-zebra (HOWE, 2013). Por possuir traços biológicos bem definidos pela ciência, o peixe-zebra provou ser um modelo útil em pesquisas no âmbito da toxicologia (DIPP et al, 2018) e tem sido utilizado para estudar compostos que variam desde metais de ocorrência natural, componentes sintéticos de produtos consumíveis e pesticidas, entre outros (BAMBINO, 2017).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A importância da qualidade da água

Segundo Anderson (2013), a água é vital para todas as criaturas vivas, sendo importantíssima para a produção agrícola e industrial, proporcionando inúmeros benefícios para o meio ambiente, bem como para os indivíduos que o habitam.

Para garantir o desenvolvimento de uma região, bem como de uma nação, é necessário assegurar o acesso à água potável, principalmente como uma questão de saúde (WHO, 2011). Ainda segundo a Organização Mundial de Saúde, o investimento em abastecimento de água e saneamento básico, pode gerar benefícios para a economia dependendo da região, pois os gastos com o combate à doenças potencialmente causadas por uma água de má qualidade seriam reduzidos.

A água fornecida deve ser o mais segura possível, configurando assim o conceito de água potável, que deve ser obtida e distribuída a todos, atingindo um suprimento satisfatório, mediante a todo esforço que se faça necessário (WHO, 2011). A definição de água potável segura, conforme as diretrizes definidas pela Organização Mundial de Saúde, diz que: a água não deve apresentar risco à saúde durante todo o período de consumo. Não somente para a ingestão, bem como para a preparação de alimentos e higiene pessoal, uma água potável de qualidade se torna indispensável (WHO, 2011).

2.2. Visão histórica da toxicologia aquática

Segundo Nikinmaa (2014):

Enquanto as populações humanas permaneceram pequenas, as influências antropogênicas sobre os ambientes aquáticos permaneceram pequenas e locais. Provavelmente, o primeiro problema ambiental aquático de maior escala resultou de canos de água de chumbo que foram usados em grandes cidades romanas. Mais tarde, um grande problema ambiental aquático foi gerado, quando os sistemas de esgoto foram construídos e as pessoas começaram a usar banheiros (WCs). Consequentemente a água, urina e fezes domésticas contaminadas foram descartadas diretamente nas águas circunvizinhas

Na idade média, os retrocessos causados à higiene humana e à eliminação dos esgotos, devido ao aparecimento de grandes cidades, fez com que cerca de 25 milhões de pessoas fossem a óbito, em consequência de epidemias de tifo, peste negra e varíola (KLIGERMAN, 2001).

A importância de um tratamento adequado para a água utilizada por uma determinada comunidade já se provou fundamental, devido a eventos do passado, sendo um deles, o maior marco no campo da epidemiologia moderna, o surto de cólera na área de Westminster, em Londres, no ano de 1854. Acontecimento no qual, durante um período de 10 dias, cerca de 5 mil pessoas vieram a óbito (MCLEOD, 2000). Nessa ocasião, John Snow provou que a bactéria causadora do surto era transmitida pela água e não pelo ar, como muitos pensavam na época (KOCH, 2009).

Outro fator ambiental que ocorreu até a última parte do século XX, foi a acidificação de rios e lagos nas ilhas britânicas. Ao final de 1800, após industrialização, a queima de carvão contribuía para a chuva ácida e acidificação de corpos d'água (NIKINMAA, 2014).

Em 1956, a região da baía de Minamata, Japão, vivenciou uma das piores tragédias da história da toxicologia aquática, onde mais de 100 pessoas perderam suas vidas após ingerir peixes com altos níveis de metilmercúrio e outras milhares sofrem os efeitos da intoxicação a longo prazo desde os anos 50 (KUDO, 1998). Mesmo nos dias atuais o mercúrio ainda se apresenta como uma ameaça. Inúmeras fontes antropogênicas afetam a biota aquática, mesmo nas regiões mais distantes e menos populosas, um exemplo disso são concentrações crescentes de metilmercúrio que se encontram difusas por todo o globo (HOFFMAN, 2003).

2.3. Toxicologia aquática na atualidade

A toxicologia aquática continua contribuindo para a manutenção do bem-estar e da qualidade de vida das populações ao redor do mundo. Um grande exemplo disso, ocorreu em 5 de novembro de 2015, quando o Brasil vivenciou o pior desastre ambiental de sua história, o rompimento da barragem de Fundão em Mariana, região central do estado de Minas Gerais. O resultado do desastre foi o derramamento de 50 a 60 milhões de m³ de lama em Gualaxo do Norte, rio que faz parte da Bacia do Rio Doce. O resultado do desastre alcançou o Oceano Atlântico 17 dias após o

rompimento da barragem, através dos rios Gualaxo do Norte, do Carmo e Doce (SEGURA, 2016). Valores de Ferro (Fe) e Manganês (Mn) encontrados em águas residuais, afetadas pela lama, eram 4 e 1,5 vezes mais altos do que os valores de referência preconizados pela legislação brasileira (SEGURA, 2016). Durante todo o processo de recuperação ambiental e econômica da região, a toxicologia aquática vem sendo uma ferramenta fundamental para monitorar o nível de poluentes nos rios afetados.

Em 25 de janeiro de 2019, mais um capítulo infortuno da história ambiental brasileira foi escrito, desta vez com o rompimento de uma das barragens da mina Córrego do Feijão, em Brumadinho, Minas Gerais. Durante o rompimento da barragem, cerca de 12 milhões de m³ de rejeitos úmidos de minério de ferro percorreram o ribeirão Ferro-Carvão, alcançando o Córrego do Feijão e a cidade de Brumadinho (ROMÃO, 2019). A tragédia de Brumadinho fez mais de 230 vítimas identificadas, prejuízos socioeconômicos, isolamento de comunidades que potencializou a falta de acesso a serviços de atenção básica à saúde, o que pode agravar casos de doenças crônicas e doenças mentais como ansiedade e depressão, devido ao estresse causado (ROMÃO, 2019). Já no âmbito ecológico, segundo pesquisadores do Centro Integrado de Estudos Georreferenciados para a Pesquisa Social (CIEG), da Fundação Joaquim Nabuco, os rejeitos de mineração da barragem de Brumadinho atingiram os Rios São Francisco e Paroapeba, na represa de Três Marias, após 12 dias do ocorrido. A constatação foi realizada através de técnicas observacionais de imagens de satélite e coletas de amostras de água, o que levou à descoberta de possíveis marcadores de metais pesados presentes na água, que inclusive já poderia estar sendo consumida pela população.

Apesar de impactantes, grandes desastres não são as únicas preocupações ambientais na atualidade. O forte crescimento da indústria automobilística e a energia necessária para manter os veículos nas ruas, faz com que a demanda por petróleo aumente cada vez mais (NIKINMAA, 2014), cenário que se apresenta altamente dispendioso para o meio ambiente, devido aos gases produzidos durante os processos de extração, transporte e consumo desse material. Ainda existe o risco de acidentes com oleodutos e navios petroleiros, que causam desastres ambientais de proporções catastróficas (GREENPEACE, 2019).

Além disso, um grupo de toxicantes que vem ganhando atenção nos estudos da toxicologia aquática durante os últimos anos, são os contaminantes emergentes.

Essa definição refere-se à substâncias que não se encaixam no grupo de contaminantes clássicos, ou seja, não foram detectadas anteriormente ou quando detectadas, suas concentrações eram baixas demais para levantar uma questão de saúde pública (BAI, 2018). Segundo a Agência de Pesquisa Geológica dos Estados Unidos (USGS, 2012), se encaixam nesse grupo, fármacos isentos ou não de prescrição médica, produtos de higiene, bem como seus conservantes e outros aditivos químicos, praguicidas, surfactantes, dentre outros.

Ainda segundo a USGS, um dos institutos que mais tem pesquisado contaminantes emergentes no mundo, esses toxicantes estão inseridos no meio ambiente devido à sua presença em ambientes como estações de tratamento de esgoto e efusões de superfícies terrestres agrícolas e urbanas (USGS, 2012).

Direta ou indiretamente, a atividade humana resulta em fármacos presentes em águas residuais, fazendo dessas substâncias as primeiras colocadas nas listas de contaminantes emergentes de interesse em saúde pública (FERRER, 2013). Estudos conduzidos pela Agência de Pesquisa Geológica dos Estados Unidos, revelaram a detecção de fármacos em 80% de todas as águas superficiais. Compostos farmacêuticos como, esteroides, antibióticos, analgésicos e anti-hipertensivos, foram encontrados, totalizando 82 compostos (FERRER, 2013). Localmente, na região do Distrito Federal, estudos prévios realizados no Lago Paranoá, revelaram que contaminantes emergentes frequentemente encontrados foram: atenolol, atrazina, cafeína e carbamazepina (CAVALCANTI, 2017).

2.4. Monitoramento de contaminantes

Em relação aos contaminantes clássicos, a água tratada no Brasil passou a ser monitorada, bem como valores de referência para concentrações máximas foram estabelecidos tanto para contaminantes orgânicos, quanto para inorgânicos com a Portaria BSB nº 56/1977. A medida que a indústria se desenvolveu, e a globalização introduziu o avanço tecnológico, novos toxicantes surgiram, tornando-se necessária a revisão e ampliação das relações de contaminantes de monitoramento obrigatório (CAVALCANTI, 2017).

O resultado das melhorias feitas em relação aos padrões de potabilidade, juntamente com a preocupação relacionada ao dano que essas substâncias podem

causar à saúde, culminou na elaboração da Portaria Nº 2914, publicada em 12 de dezembro de 2011, pelo Ministério da Saúde, que determina valores de referência para padrões: microbiológicos, de turbidez, de agrotóxicos, de cianotoxinas, organolépticos, orgânicos, inorgânicos e para desinfetantes e seus produtos secundários, para mais de 85 substâncias (BRASIL, 2011).

Quanto aos contaminantes emergentes, uma parte já recebe monitoramento em alguns países europeus e nos Estados Unidos, porém ainda existem aqueles que não são contemplados pela fiscalização, especialmente no Brasil, onde a maioria dos contaminantes emergentes não tem valores de referência estabelecidos (CAVALCANTI, 2017).

2.5. Tratamento de efluentes

Um grande benefício oriundo do tratamento de efluentes é a amplificação do uso de recursos hídricos. Segundo a CAESB (2018):

Geralmente a própria natureza possui a capacidade de decompor a matéria orgânica presente nos rios, lagos e no mar. No entanto, no caso dos efluentes essa matéria se apresenta em grande quantidade, exigindo um tratamento mais eficaz em uma Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) que, basicamente, reproduz a ação da natureza de maneira mais rápida.

Esgoto, efluentes, águas residuais ou águas servidas, são todos os resíduos líquidos domésticos e industriais que recebem tratamento adequado para que sua qualidade aumente, por meio da remoção de contaminantes, e assim possam ser devolvidos à natureza sem causar prejuízos à ecossistemas e danos à saúde humana (CAESB, 2018).

Segundo a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005 da CONAMA, as águas doces, salobras e salinas do Território Nacional são classificadas em níveis de enquadramento, conforme a qualidade requerida para os seus usos prevaletentes. As águas doces (salinidade igual ou inferior a 0,5%) podem se encaixar em quatro tipos de enquadramento, sendo que para o abastecimento destinado ao consumo humano, deve-se qualificar pelo menos no enquadramento três. Já em relação as águas salobras (salinidade superior a 0,5% e inferior a 30%), existem quatro tipos de classes (contando com a classe especial), aonde apenas a classe um está destinada

ao consumo humano. As águas salinas (salinidade superior a 30%), não estão destinadas ao consumo humano. Dentre os padrões avaliados pela CONAMA para avaliar se a água está admissível para o consumo humano, estão: ausência de materiais flutuantes, óleos, graxas e substâncias que configurem cor e ou odor, medição da turbidez e pH, a não verificação de efeito tóxico crônico a organismos, análise de padrões específicos como os níveis de clorofila a, cianobactérias e coliformes totais.

Por contar com diversos patógenos de origem química e biológica, os efluentes devem ser tratados, a fim de não apresentarem riscos à saúde da população. O fornecimento de água de qualidade previne o aparecimento de casos de doenças de veiculação hídrica, sendo as principais: amebíase, giardíase, gastroenterite, febre tifoide e paratifoide, hepatite infecciosa e cólera. Verminoses como a esquistossomose, ascaridíase, teníase, oxiuríase e ancilostomíase, também podem ser transmitidas pela água (ROSA, 2012).

Diversas substâncias, incluindo compostos farmacêuticos podem sofrer diferentes transformações físico-químicas na água, inclusive enquanto passam por ETEs (METCALFE, 2010). Apesar de todo aparato utilizado no processo de limpeza de efluentes, existe a possibilidade de contaminantes permanecerem na água tratada (METCALFE, 2010). Muitos desses contaminantes residuais presentes na água tratada apresentam ameaça tanto para ecossistemas (REJMENT, 2016), quanto para seres humanos.

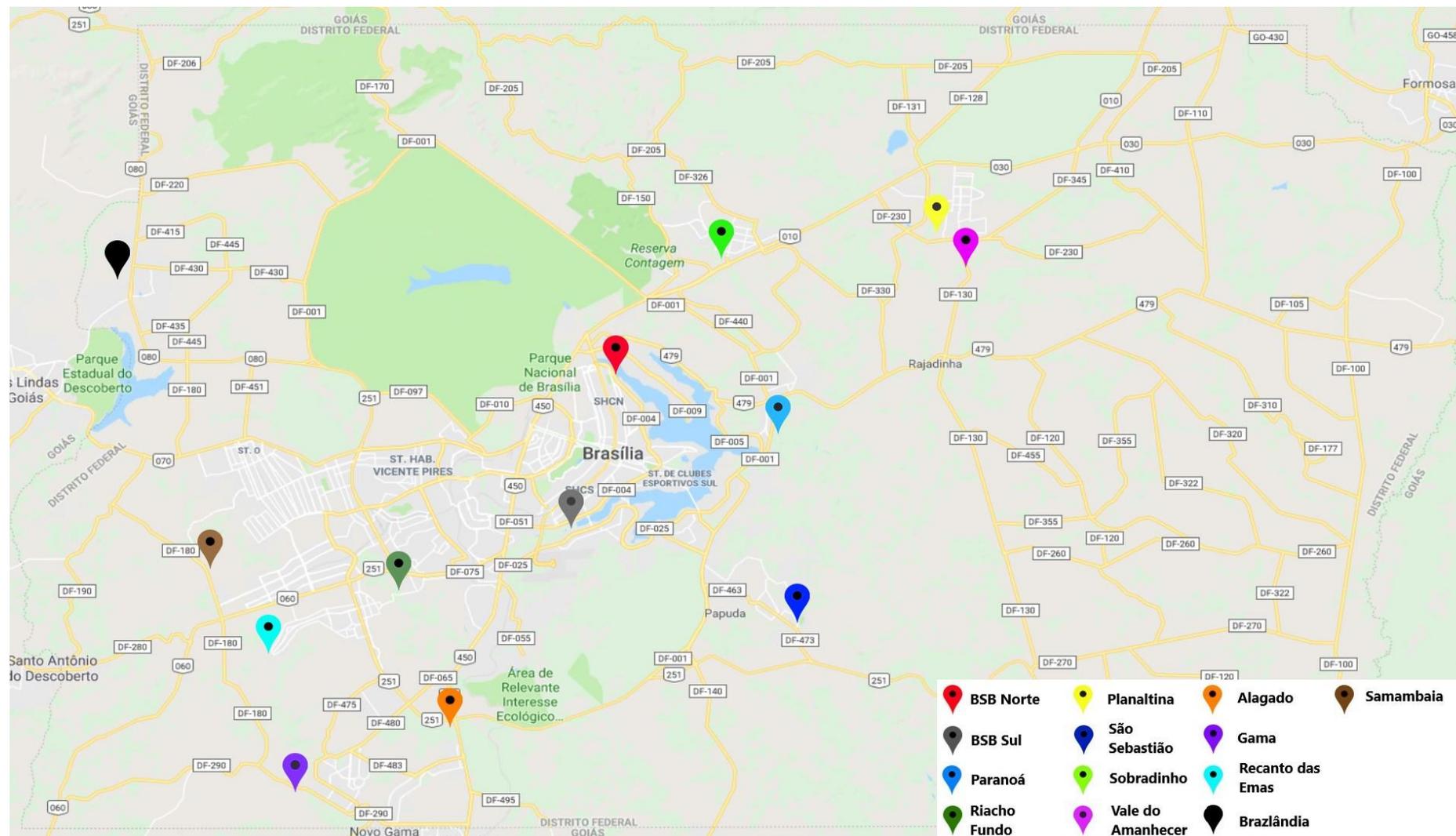
2.6. Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs)

No Distrito Federal, o sistema de esgotamento sanitário é composto por 15 Estações de Tratamento, segundo o Plano Distrital de Saneamento Básico e de Gestão Integrada de Resíduos Sólidos (PDSB), de setembro de 2017 (GDF, 2017). Dessas ETEs, 12 necessitam de melhorias e ou ampliações até o fim do Plano, que foi projetado até 2037. Os motivos pelos quais os incrementos se fazem necessários são diversos, dentre eles, os principais são problemas operacionais, falta de capacidade hidráulica atual e futura, alta carga orgânica na entrada da estação, lançamentos do esgoto tratado em lagoas que irão servir como fontes de abastecimento de água, adaptação do tratamento de acordo com a classe de

enquadramento e vazão reduzida dos corpos receptores, especialmente na estiagem (GDF, 2017).

A figura 1 ilustra as 13 ETEs do Distrito Federal estudadas no presente trabalho. Em relação aos tratamentos realizados atualmente, nem todas as ETEs do Distrito Federal possuem métodos de tratamento iguais, apesar de serem considerados muito consistentes. Os tratamentos realizados em cada ETE serão descritos a seguir.

Figura 1. Mapa do Distrito Federal, contendo a localização das 13 ETEs avaliadas através de testes com bioindicadores.



Fonte: Google Maps, Google LLC.

2.6.1. ETE Alagado

A ETE Alagado possui um tratamento em reator anaeróbio de fluxo ascendente (RAFA), seguido por lagoa aeróbia de alta taxa, com o efluente sendo disperso em campos de escoamento superficial (*wetland*) e finalmente recebe um polimento químico, para redução da concentração de fósforo por precipitação (GDF, 2017). Segundo o PDSB, o método de tratamento não precisa sofrer alterações, possui tecnologia interessante apesar da aridez do solo, devendo ser considerada apenas a ampliação e possíveis melhorias na remoção do nitrogênio (49,6%) e coliformes (efluente com $3,9 \times 10^4$ NMP/100 ml).

2.6.2. ETE Brasília Norte

Na ETE BSB Norte, um tanque equalizador de vazão, por decantador primário, reator biológico de nutrientes, decantador secundário, seguido de um polimento químico, são usados no tratamento (GDF, 2017). Segundo o PDSB, não necessita de ampliação em sua capacidade hidráulica, porém investimentos para suportar uma maior entrada de carga orgânica são necessários.

Ainda de acordo com o PDSB, a remoção de coliformes não é ideal (efluente com $3,4 \times 10^4$ NMP/100 ml), entretanto, a ETE possui excelente eficiência de remoção de todos os outros parâmetros. O processo de tratamento não necessita sofrer mudanças, com a condição de que haja terreno para uma extensão futura (GDF, 2017).

2.6.3. ETE Brasília Sul

Na ETE BSB Sul, o tratamento é realizado por decantador primário, reator biológico aeróbio com remoção de nutrientes, decantador secundário, seguido de um polimento químico (GDF, 2017). Apesar da capacidade hidráulica estar em boas condições, faz-se necessário o aumento de investimentos para suportar uma maior entrada de carga orgânica, mesmo se houvesse a reversão de parte do esgoto de Águas Claras, para a ETE Melchior (GDF, 2017).

Conforme o PDSB, a ETE possui grande eficiência na remoção de todos os parâmetros, porém o aumento na capacidade de remoção do nitrogênio (76,6%) e coliformes (efluente com $9,1 \times 10^4$ NMP/100 ml) seria interessante. Considerando esses fatores, o processo de tratamento não precisaria de modificações, se houvesse terreno para a ampliação (GDF, 2017).

2.6.4. ETE Brazlândia

Conta com um tratamento por lagoa anaeróbia seguida de lagoa facultativa. O projeto atual já não preconiza a demanda necessária para suportar uma maior entrada de carga orgânica, todavia, a capacidade hidráulica está dentro dos padrões desejados (GDF, 2017). Conforme o PDSB, a ETE possui baixa eficiência de remoção de nitrogênio (57,1%), fósforo (40,8%), sólidos suspensos (64,8%) e coliformes (efluente com $6,2 \times 10^5$ NMP/100 ml), devido a esses fatores o processo de tratamento deve ser modificado, para que o efluente tratado possa ser despejado no lago Descoberto. A solução oferecida é a construção de métodos com lodos ativados, para a remoção biológica de fósforo e nitrogênio (GDF, 2017).

2.6.5. ETE Gama

A ETE tem como recurso o tratamento em reator anaeróbio de fluxo ascendente (RAFA) seguida por reatores biológicos e decantador secundário, conta com ótima eficiência de remoções e seus parâmetros de capacidade hidráulica e carga orgânica estão dentro dos padrões (GDF, 2017). Possíveis melhorias contariam com substituição dos sopradores para aumento da eficiência de energia e no tratamento preliminar (GDF, 2017).

2.6.6. ETE Paranoá

A estação Paranoá possui um tratamento em reator anaeróbio de fluxo ascendente (RAFA), seguida por lagoa aeróbia de alta taxa. A ETE tem baixa

eficiência de remoção de nitrogênio (37%), fósforo (25,2%), sólidos suspensos (51,7%) e coliformes (efluente com $2,3 \times 10^6$ NMP/100 ml), e a ampliação da capacidade hidráulica e carga orgânica faz-se necessária (GDF, 2017). A construção de um RAFA seguido de biofiltro aerado submerso com remoção biológica de nitrogênio e química do fósforo, sendo adaptado no decantador secundário, seriam as soluções propostas (GDF, 2017).

2.6.7. ETE Planaltina

Conta com um tratamento em reator anaeróbio de fluxo ascendente (RAFA) dentro da lagoa facultativa, seguido por lagoa de maturação (GDF, 2017). De acordo com o PDSB, somente em 2024 a capacidade hidráulica necessária de ampliação, porém a carga orgânica é superior em relação ao projeto em vigor, apresenta baixa eficiência na remoção de nitrogênio (41,1%), fósforo (28,4%) e coliformes (efluente com $2,7 \times 10^4$ NMP/100 ml). Fósforo e coliformes, não atingiram os níveis preconizados para a classe 3 de enquadramento, nos estudos de autodepuração (GDF, 2017).

A construção de um RAFA (externo à lagoa facultativa) e futuramente, a ampliação da lagoa facultativa com decantador, são algumas propostas apresentadas pelo Plano Distrital de Saneamento Básico, como soluções para os problemas enfrentados.

2.6.8. ETE Recanto das Emas

Essa ETE tem como recursos de tratamento, um reator anaeróbio de fluxo ascendente (RAFA) seguido por reator aerado e lagoa aerada facultativa, a carga orgânica é bem superior ao projeto que está em vigor, já a capacidade hidráulica não necessita de expansão (GDF, 2017). A remoção de nitrogênio (17,5%) e coliformes (efluente com $1,2 \times 10^6$ NMP/100 ml) demonstra baixa efetividade e em razão da baixa vazão do córrego Vargem da Benção, somente o parâmetro oxigênio dissolvido apresenta-se dentro dos limites preconizados para a classe 2 de enquadramento (GDF, 2017).

A construção de um RAFA seguido por biofiltro aerado submerso é uma das

propostas apresentadas pelo Plano Distrital de Saneamento Básico, como solução para os problemas enfrentados (GDF, 2017).

2.6.9. ETE Riacho Fundo

A estação Riacho Fundo possui um tratamento em tanque fermentador seguido por reatores biológicos (em batelada), não sendo necessária a expansão da capacidade hidráulica e carga orgânica até o final do PDSB. A remoção de nitrogênio (48,5%) e coliformes (efluente com $9,3 \times 10^5$ NMP/100 ml) apresentou baixa efetividade, porém não foram propostas melhorias e ampliações para a ETE (GDF, 2017).

Segundo o PDSB, a desativação da ETE já foi considerada, devido a capacidade de suporte do braço do Riacho Fundo ser alcançado, se isso ocorresse, a reversão do esgoto seria direcionada a alguma outra ETE (Melchior ou Samambaia ou Recanto das Emas), caso não ocorra a reversão, melhorias na ETE seriam propostas (GDF, 2017).

2.6.10. ETE Samambaia/Melchior

O tratamento conta com um reator anaeróbio de fluxo ascendente (RAFA) seguida por lagoa aeróbia de alta taxa e de maturação, recebendo por fim, um polimento químico, a carga orgânica e capacidade hidráulica necessitariam de ampliação (GDF, 2017).

A capacidade de remoção de nitrogênio (15,2%) e coliformes (efluente com $8,8 \times 10^4$ NMP/100 ml) estão abaixo do esperado (GDF, 2017). Ainda conforme o PDSB, parte da vazão da ETE Melchior é desviada para a ETE Samambaia, o que prejudica a sua funcionalidade na remoção dos parâmetros, fazendo com que mesmo a autodepuração causada pela confluência com o Rio Descoberto não cause a obtenção dos níveis preconizados para a classe 2 de enquadramento. A solução proposta, é a melhoria da ETE Melchior, para que a sobrecarga sofrida pela ETE Samambaia seja atenuada (GDF, 2017).

O tratamento do excedente da bacia Samambaia é tratado na ETE Melchior.

Essa estação possui um tratamento em reator anaeróbio de fluxo ascendente (RAFA) seguida de reator biológico UNITANK. Segundo o PDSB, A ETE Melchior precisaria ser ampliada em termos de capacidade hidráulica devido à reversão de esgoto de parte da Águas Claras. A carga orgânica na entrada da estação já era superior ao desejado conforme o que visava o projeto de lei atual. A eficiência do tratamento se encontrava reduzida devido à problemas operacionais em comportas, registros, sopradores, tratamento preliminar e RAFA, por isso, melhorias foram propostas para a ETE no PDSB.

2.6.11. ETE São Sebastião

Na ETE São Sebastião, o tratamento é realizado através de um reator anaeróbio de fluxo ascendente (RAFA) seguida por campos de escoamento superficial (wetlands) e lagoa de maturação (GDF, 2017). No PDSB, a expansão necessária para a capacidade hidráulica foi prevista para 2018, porém a carga orgânica já se encontrava bem superior ao projeto em vigor, a ETE apresenta baixa eficiência na remoção dos parâmetros nitrogênio (48,4%), fósforo (56,9%) e coliformes (efluente com $6,2 \times 10^4$ NMP/100 ml).

Os parâmetros DBO, nitrogênio, fósforo e coliformes não correspondem aos níveis preconizados para a classe 3 de enquadramento, segundo estudos de autodepuração através da análise de amostras coletadas a jusante da ETE, na confluência do rio São Bartolomeu (GDF, 2017).

Devido a esses fatores, o método de tratamento necessita ser modificado, as propostas apresentadas são a construção de um RAFA seguido de biofiltro aerado submerso com remoção biológica de nitrogênio, seguido de polimento final com aplicação de sal de ferro ou alumínio para precipitação do fósforo, em unidade de mistura rápida e floculação, além da expansão da ETE (GDF, 2017).

2.6.12. ETE Sobradinho

Conta com um tratamento composto por decantador primário, reator biológico seguido de decantador secundário, no PDSB, a expansão necessária para a capacidade hidráulica foi prevista para 2018, porém para a carga orgânica, somente em 2023. Nitrogênio (31,2%), fósforo (34,7%) e coliformes (efluente com $8,2 \times 10^6$

NMP/100 ml), revelaram baixa eficiência de remoção (GDF, 2017).

Conforme o PDSB, os parâmetros DBO, fósforo e coliformes não correspondem aos níveis preconizados para a classe 3 de enquadramento, segundo estudos de autodepuração, através da análise de amostras coletadas a jusante da ETE. As propostas de melhoria para a Estação se baseiam no tratamento secundário, desnitrificação em zona anóxica, recirculando o efluente aerado e o lodo para zona anóxica e precipitação química, no decantador secundário (GDF, 2017).

2.6.13. ETE Vale do Amanhecer

Essa ETE tem como processo de tratamento um reator anaeróbio de fluxo ascendente (RAFA) seguida por lagoa aerada, facultativa e maturação (GDF, 2017). Segundo o PDSB, só haverá necessidade de expansão da capacidade hidráulica no ano de 2031, apesar da carga orgânica já estar superior ao projeto em vigor, a eficiência para a remoção do nitrogênio (22,1%), fósforo (30,5%) e coliformes (efluente com $3,1 \times 10^4$ NMP/100 ml) encontra-se baixa.

O estudo de autodepuração da Estação, juntamente com a influência do efluente vindo da ETE Planaltina, mostram que os parâmetros nitrogênio, fósforo e coliformes não correspondem aos níveis preconizados para a classe 2 de enquadramento. Dentre as propostas de melhoria para a ETE, está a construção de um RAFA seguido de biofiltro aerado submerso com remoção biológica de nitrogênio e fósforo (GDF, 2017).

Em virtude do potencial efeito nocivo de substâncias que não são totalmente eliminadas nas ETEs, faz-se necessária a análise toxicológica de efluentes, e para isso o campo da toxicologia ambiental conta com diversas ferramentas a fim de analisar o risco apresentado a organismos diferenciados. Uma das abordagens mais precisas para tais análises é o uso de bioindicadores.

2.7. Bioindicadores

São espécies, comunidades ou processos biológicos, que possuem características como: boa estabilidade, independente de variações climáticas e ambientais, grande abundância, resposta de acordo com a concentração do toxicante ou grau de degradação do ambiente, perfil biológico bem documentado e observação simples com bom custo benefício (HOLT, 2010).

2.7.1. *Allium cepa*

Muitos testes de toxicidade atraem diversas críticas éticas por usarem um modelo de bioindicador baseado em mamíferos, como ratos e camundongos, além disso, são de alto custo, demandando muito tempo e preparo do pesquisador (SIDDIQUI, 2011). Dessa forma, testes com plantas são usados em larga escala, por apresentarem maior simplicidade de realização, bem como uma boa correlação com outros testes de toxicidade (SIDDIQUI, 2011). Plantas em geral, são sensíveis a uma grande variedade de contaminantes, especialmente aos HAPs, pesticidas, metais e fármacos. Quando se trata da *Allium cepa*, uma de suas principais vantagens é a ausência da necessidade de preparo prévio para qualquer tipo de amostra líquida, antes que a exposição seja realizada (WIECZERZAK, 2016).

As raízes de *Allium cepa*, funcionam muito bem para a observação em microscópio óptico, sendo referência por suas células apresentarem cromossomos grandes e de número reduzido ($2n = 16$) (FISKESJÖ, 1985; LEME & MARIN-MORALES, 2009). Pode-se observar com facilidade as fases mitóticas (prófase, pormetáfase, metáfase, anáfase e telófase) (FISKESJO, 1985).

Segundo Leme (2009), as amostras mais propícias para a aplicação do teste de *A. cepa* são praguicidas, o produto (lodo) gerado por ETEs, efluentes provenientes de diversos tipos de indústrias, metais, corantes e água potável.

2.7.2. *Danio rerio* (Peixe-zebra)

O teste de toxicidade aguda em peixe (AFT, do inglês acute fish toxicity test) é um dos principais testes requeridos pela União Europeia (UE) no âmbito legal para

produtos químicos industriais, biocidas e alguns produtos farmacêuticos (Dang, 2017). O AFT é um dos poucos testes regulatórios requeridos que usam a morte como um endpoint (estágio final de observação) (Dang, 2017). Esse tipo de teste tem levantado grande questionamento de organizações que defendem o bem-estar animal, pois acredita-se que os peixes passam por grande desconforto e dor, apresentando uma divergência com o que defendem as legislações de direitos dos animais (LAMMER, 2009).

Em razão desses fatores, pesquisadores buscaram outras opções de testes menos agressivos, porém, com a mesma confiabilidade científica. Surgiu então, o teste de toxicidade aguda em embrião de peixe (FET, do inglês fish embryo toxicity test), que trabalha com o princípio de analisar a intoxicação aguda em embriões de peixe, com a vantagem de não causar dor ou sofrimento aos embriões, devido ao desenvolvimento prematuro do sistema nervoso central (Dang, 2017). Após passar por processos de validação, esse método foi aprovado e adotado pelas diretrizes de testes da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD), no ano de 2013 (Dang, 2017).

Segundo o estudo realizado por Lammer (2009), foram encontradas boas correlações entre o uso do FET e o uso do AFT em diversas espécies de peixes. Também houve boas ligações entre o FET e os valores de LC50 para diferentes espécies de peixes (MADDEN, 2012).

O método FET, partilha da filosofia dos 3Rs, estabelecida por Russell and Burch (1959), que visa minimizar o desconforto dos animais utilizados em pesquisas científicas, através dos conceitos de: reposição, redução e refinamento. A reposição visa o uso de "qualquer método científico que empregue material não senciente, que possa, na história da experimentação animal, substituir métodos que usam vertebrados vivos conscientes", já o conceito de redução prega a possível diminuição do número de animais utilizados para obter informações de uma determinada quantidade e precisão, por último, o conceito de refinamento preconiza a "diminuição na incidência ou severidade de procedimentos aplicados àqueles animais que ainda têm que ser usados."

Além das vantagens em relação às questões éticas e legislações vigentes, outras principais vantagens para a escolha do método FET são a criação simples, crescimento rápido, transparência dos ovos e avaliações não invasivas, entre outras (MADDEN, 2012).

Os peixes são usados amplamente como parâmetros para mensurar a qualidade da água utilizada pelos seres humanos (LAMMER, 2009), e devido a todas as vantagens citadas previamente, o peixe-zebra se mostra um importante bioindicador a ser utilizado na toxicologia aquática.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Analisar os efeitos citotóxicos e mutagênicos, que amostras de água coletadas tanto a montante, quanto a jusante de regiões de descarga de Estações de Tratamento de Esgoto, causam em bioindicadores.

3.2. Objetivos específicos

- a) Avaliar amostras de água a montante e a jusante de regiões de descarga de ETEs, quanto ao potencial em interferir na mitose de células meristemáticas de *Allium cepa*.
- b) Avaliar amostras de água a montante e a jusante de regiões de descarga de ETEs, quanto ao potencial em causar a mortalidade de embriões e larvas de peixe-zebra.
- c) Avaliar amostras de água a montante e a jusante de regiões de descarga de ETEs, quanto ao potencial em causar efeitos subletais no desenvolvimento de embriões e larvas de peixe-zebra.

4. JUSTIFICATIVA

O acesso à água potável é um direito humano básico, fundamental para garantir a prevenção de doenças e a manutenção da saúde (WHO, 2011). O Decreto nº 85.878 de 07/04/1981, que estabelece as normas para execução da Lei nº 3.820, de 11 de novembro de 1960, sobre o exercício da profissão de farmacêutico, define como atribuição do farmacêutico, não privativa e não exclusiva, o tratamento e controle de qualidade das águas de consumo humano, de indústrias farmacêuticas, de piscinas, praias e balneários, salvo se necessário o emprego de reações químicas controladas ou operações unitárias (item II do Art 2º - II).

Apesar da eficiência dos sistemas de tratamento de esgoto, principalmente na remoção de nutrientes e matéria orgânica, alguns contaminantes não são completamente removidos, como por exemplo os contaminantes emergentes (Liu et al. 2009; Deblonde et al. 2011; Silva, 2015).

Nesse contexto, considerando a importância da água como solvente universal, sendo um dos elementos indispensáveis para a manutenção da vida (BALL, 2001), e considerando que já foram detectados contaminantes emergentes em corpos d'água do Distrito Federal, (CAVALCANTI, 2017), um estudo utilizando bioindicadores para testar amostras d'água coletadas a montante e a jusante de 13 ETEs do DF é de extrema importância para indicar possível ocorrência de toxicidade, contribuindo na análise de corpos d'água, um dos papéis exercidos pelo farmacêutico.

5. METODOLOGIA

As coletas das amostras de água, tanto para o teste de citotoxicidade em *Allium cepa*, quanto para o teste FET em peixe-zebra, foram realizadas por responsável técnico da Agência Reguladora de Águas, Energia e Saneamento do Distrito Federal (ADASA). Os experimentos foram iniciados imediatamente após a coleta.

Segundo a Nota Técnica n.º 4/2019 da ADASA:

De forma geral, os pontos de coleta a montante estão localizados, a aproximadamente, 50 metros do emissário da estação de tratamento e o ponto a jusante localiza-se, a aproximadamente, 100 metros após o ponto de lançamento, ainda na zona de mistura. Ressalta-se que o

acompanhamento da qualidade da água do corpo receptor das ETEs Norte e Sul é feito por meio das campanhas de monitoramento realizadas no Lago Paranoá (GDF, 2019).

Devido ao corpo d'água das ETEs BSB Norte e Sul ser o Lago Paranoá, um ambiente lêntico (presença de água com pouco movimento), os pontos montante e jusante para este estudo, são referentes, respectivamente, ao afluente e efluente dessas ETEs.

5.1 Teste de citotoxicidade em *Allium cepa*

O bioensaio foi baseado em Fiskesjo (1985). Os organismos teste (*Allium cepa*), foram escolhidos pelo tamanho regular do bulbo, sendo descartados aqueles que apresentaram bulbos mofados ou ressecados. As cebolas foram adquiridas em um mercado orgânico para que não houvesse interferência indesejada de praguicidas.

Os experimentos foram conduzidos em ambiente com temperatura média de 20°C, as amostras foram mantidas refrigeradas, a uma temperatura média de 4°C, expostas a temperatura ambiente somente 1 hora antes do início do experimento. Antes do início do teste, as escamas externas dos bulbos e a placa acastanhada do fundo das cebolas foram removidas, deixando o anel primordial da raiz intacto (FISKESJO, 1985).

Os bulbos ficaram em água fresca durante o procedimento de limpeza, a fim de proteger o anel primordial de ressecamento (FISKESJO, 1985). Cada ETE avaliada teve quatro cebolas como organismos teste, duas para montante e duas para jusante, sendo que de cada cebola foram confeccionadas duas lâminas, onde 500 células foram observadas, totalizando 2000 células por montante e 2000 células por jusante (n=4, número de lâminas confeccionadas por ponto).

Segundo o teste original, descrito por Fiskesjo, o crescimento prévio das raízes foi realizado através da exposição dos bulbos à água de boa qualidade, durante um período de 24 horas, que é aproximadamente o tempo necessário para que ocorresse o crescimento de cerca de 1-2 cm das raízes. Após a exposição prévia, os bulbos de *A. cepa* foram expostos a amostras de água, coletadas tanto a montante, quanto a jusante de ETEs, por um período de 24 horas, após esse período houve a reposição das amostras de água, para evitar que o nível ficasse abaixo do desejado, pois isso

faria com que o bulbo perdesse o contato com o líquido teste. Após a reposição das amostras, a exposição durou mais 24 horas, totalizando 48 horas. Ao final do processo de exposição, foram removidos dos bulbos, fragmentos de raiz com cerca de 3 mm de comprimento cada.

Após coletados, os fragmentos foram lavados e posteriormente fixados em solução de Carnoy (etanol:ácido acético = 3:1), por aproximadamente 1 hora. Após a fixação, os fragmentos de raiz foram lavados e posteriormente hidrolizados por meio de solução de HCL 1M, em banho-maria a 60°C, por 10 minutos. Em seguida, a hidrólise foi interrompida por meio de lavagem com água destilada gelada. A confecção das lâminas se deu por meio da técnica de esmagamento, utilizando-se solução de orceína lacto-acética 1%, para a coloração.

As fases da mitose consideradas na análise microscópica foram: prófase, prometáfase, metáfase, anáfase e telófase. Segundo Humphrey (2005), a intérfase é o estágio entre as fases da divisão celular, onde os cromossomos se encontram geneticamente ativos por estarem descondensados.

Na prófase ocorre a condensação dos cromossomos, e por fim acontece o rompimento do envelope nuclear. Já na prometáfase, o fuso mitótico é formado, bem como uma série de outros fatores fundamentais para o prosseguimento da divisão celular ocorrem, dentre eles são observados, o estabelecimento do eixo do fuso bipolar, o correto posicionamento das cromátides irmãs nos polos opostos do fuso mitótico, o alinhamento dos cromossomos próximo ao equador do fuso (HUMPHREY, 2005). Durante a metáfase os cromossomos se alinham ao longo da placa metafásica. A separação das cromátides irmãs, componentes de cada cromossomo, formam dois cromossomos autônomos, esse processo dá-se na anáfase (HUMPHREY, 2005). O processo que consolida a mitose chama-se telófase, onde os cromossomos se descondensam e as cromátides são protegidas pela formação de um envelope nuclear, após isso a célula-mãe está pronta para se dividir em duas células-filhas, cada uma com seu próprio núcleo (HUMPHREY, 2005).

Para a análise de citotoxicidade, foram contadas 2000 células (500 por lâmina), observando-se e quantificando-se o número de células em divisão, a fim de determinar o índice mitótico (IM), que segundo Fiskesjo, é o número de células em mitose, dividido pelo total de células observadas, multiplicado por 100. Análises microscópicas foram realizadas com aumento de 400x.

5.2 Teste de toxicidade aguda em embrião de peixe (FET)

Os embriões de peixe-zebra foram fornecidos pelo biotério estabelecido no Departamento de Genética e Morfologia da Universidade de Brasília. No biotério, peixes adultos permaneceram em sistema de recirculação ZebTEC (Tecniplast, Itália) e foram mantidos em aquários com osmose reversa e água filtrada com carvão ativado. A temperatura é constantemente mantida a $26,0 \pm 1$ C, amônia $<0,01$ mg / L, condutividade a 750 ± 50 mS / cm, pH a $7,5 \pm 0,5$ e oxigênio dissolvido igual ou acima de 95% de saturação. Os peixes são mantidos em um ciclo de fotoperíodo de 12:12 h (claro: escuro).

Os peixes adultos não foram utilizados no experimento. Os ovos de peixe-zebra, que foram utilizados no experimento, foram obtidos pela criação de peixes no sistema de criação Ispawn (Tecniplast). No dia anterior à reprodução, machos e fêmeas foram sequencialmente adicionados ao sistema e mantidos separados por um divisor, em uma proporção de dois machos para uma fêmea. No início da manhã, o divisor foi removido e a plataforma de desova foi levantada para iniciar a desova. Os ovos foram coletados imediatamente após a fecundação natural, enxaguados em água e verificados sob um estereomicroscópio (Microscópio de Zoom Estereoscópico e Stemi 2000, Zeiss, Alemanha). Os ovos não fertilizados ($<20\%$) e aqueles com irregularidades de clivagem ou lesões foram descartados. Os ovos que não foram utilizados nos experimentos foram mantidos na instalação para criação.

O teste de toxicidade de embriões de peixe foi realizado conforme as recomendações da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD), segundo o que preconiza o seu guia para testes de substâncias químicas (OECD n° 236).

Embriões de peixe-zebra foram expostos ao controle negativo, e as amostras de água de 13 pontos tanto a montante quanto a jusante das ETEs, totalizando 27 exposições (1 controle negativo + 13 amostras a montante + 13 amostras a jusante).

O teste foi realizado com 72 ovos por exposição, divididos em 3 replicatas em microplacas de 24 poços (1 ovo por poço da placa). Um total de 20 poços foram preenchidos com 2 mL da amostra a que foi exposta (controle ou amostra de água coletada de um dos pontos). O total de 4 poços restantes de cada placa compreenderam o controle interno da placa e foram preenchidos com 2mL de água do próprio sistema dos peixes (conforme exigido pela diretriz da OECD). Cada poço

recebeu um ovo. O teste foi iniciado imediatamente após a fertilização e continuou por 96 horas em uma câmara climática (SL-24 Solab Científica, Brasil). Embriões e larvas foram observados diariamente sob um estereomicroscópio.

Parâmetros de desenvolvimento foram avaliados em embriões durante o período de teste usando uma ampliação de 70X para ovos e X40 para embriões eclodidos. Os *endpoints* foram avaliados segundo a OECD n°236 (Organisation for Economic Cooperation and Development, 2013) e Nagel, 2002, sendo esses:

- Letalidade: ovo coagulado, cauda não desprendida, ausência de somitos e batimentos cardíacos.
- Subletalidade: desenvolvimento dos olhos, movimentos espontâneos, circulação sanguínea, pigmentação e inflação da bexiga natatória.
- Teratogenicidade: malformação na cabeça, otólitos, cauda ou coração, escoliose, raquitismo, deformidade no saco vitelínico e alterações no crescimento.

A distinção entre desenvolvimento embrionário normal e anormal foi estabelecida de acordo com a descrição da embriogênese de *Danio rerio* publicada por Kimmel et al. (1995). O controle negativo foi composto apenas por água do sistema dos peixes.

A OECD é uma organização intergovernamental constituída de 34 países da América do Norte, Europa e Pacífico, com o objetivo de coordenar e harmonizar suas políticas, debater assuntos de interesses econômicos, sociais e ambientais, e colaborar para fazer frente aos problemas internacionais. Desempenha um papel fundamental na harmonização dos métodos para classificação de substâncias químicas. As diretrizes de ensaios da OECD são uma coleção de métodos de ensaio, internacionalmente aceitos, utilizados por laboratórios independentes, governos e indústrias para determinar a segurança dos produtos e preparações químicas (MCTIC, 2016).

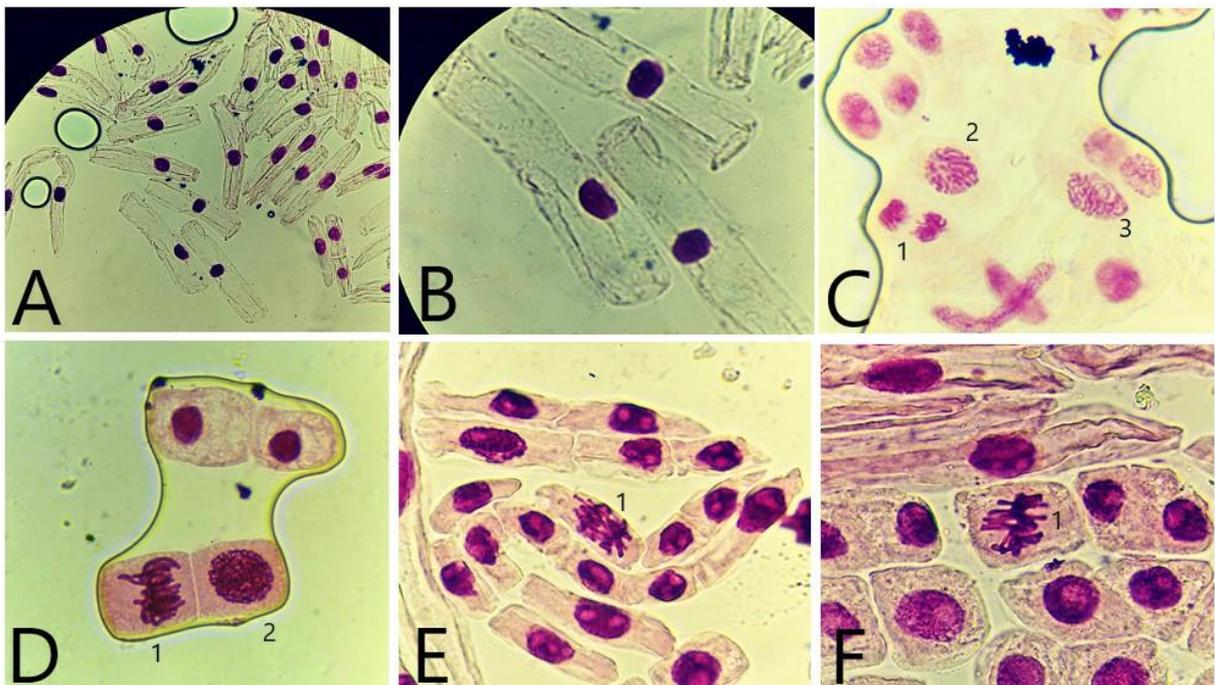
5.3. Análise estatística

Para a detecção da diferença entre os grupos testados através da distribuição normal de conjunto de dados, o teste One Way ANOVA foi usado. No caso de reprovação dos dados no teste de normalidade Shapiro-Wilk, o teste Kruskal-Wallis foi utilizado. Quando houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$), o teste de Tukey foi usado para detectar a desconformidade e revelar se a origem veio de algum grupo testado em relação ao grupo controle ou entre os grupos testados. Todos os cálculos estatísticos foram realizados através do programa SigmaPlot, versão 12.5 (SYSTAT, n.d.).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na análise de citotoxicidade em *Allium cepa*, foi observada a divisão celular do meristema da raiz do organismo teste para a análise do IM. As figuras 1 e 2 trazem imagens que exemplificam a intérfase e as fases da mitose encontradas (prófase, prometáfase, metáfase, anáfase e telófase).

Figura 2. Células meristemáticas de *Allium cepa* em intérfase e diferentes fases da mitose.



A - Células meristemáticas de *Allium cepa* em intérfase, observadas em microscópio óptico, com

aumento de 160x. **B** - Células meristemáticas de *Allium cepa* em intérfase, observadas em microscópio óptico, com aumento de 400x. **C** - Células meristemáticas de *Allium cepa* em fases de anáfase (1), prometáfase (2) e prófase (3), observadas em microscópio óptico, com aumento de 400x. **D** - Células meristemáticas de *Allium cepa* em fase de metáfase (1) e prófase (2), observadas em microscópio óptico, com aumento de 400x.. **E** - Célula meristemática de *Allium cepa* em fase de anáfase precoce (1), observada em microscópio óptico, com aumento de 400x. **F** - Célula meristemática de *Allium cepa* em fase de metáfase (1), observada em microscópio óptico, com aumento de 400x. **Fonte:** compilação do autor.

Figura 3. Células meristemáticas de *Allium cepa* em diferentes fases da mitose.

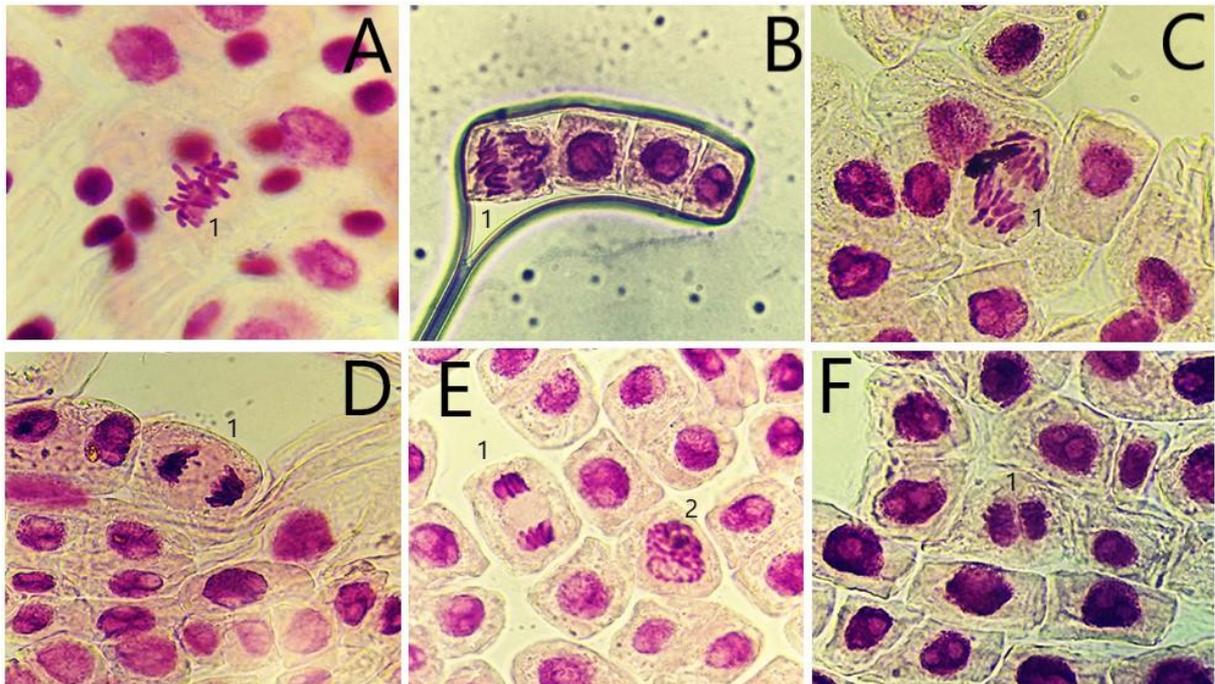


Figura 3. **A** - Célula meristemática de *Allium cepa* em fase de metáfase (1), observada em microscópio óptico, com aumento de 400x. **B** - Célula meristemática de *Allium cepa* em fase de anáfase, observada em microscópio óptico, com aumento de 400x. **C** - Célula meristemática de *Allium cepa* em fase de anáfase, observada em microscópio óptico, com aumento de 400x. **D** - Célula meristemática de *Allium cepa* em fase de anáfase tardia (1), observada em microscópio óptico, com aumento de 400x. **E** - Células meristemáticas de *Allium cepa* em fases de telófase (1) e prófase (2), observadas em microscópio óptico, com aumento de 400x. **F** - Célula meristemática de *Allium cepa* em fase de telófase (1), observada em microscópio óptico, com aumento de 400x.

Fonte: compilação do autor..

No teste com *Allium cepa*, foi realizada uma comparação dos índices mitóticos dos grupos testados em relação ao IM do controle negativo. A tabela 1 mostra valores de IM, tanto para o CN, quanto para os 13 pontos a montante das ETEs. A tabela também traz a quantidade de células em intérfase e em cada uma das fases da mitose celular (prófase, prometáfase, metáfase, anáfase e telófase). Foi observada diferença estatística significativa no IM da amostra de água obtida a montante da ETE Gama, quando comparada ao CN (Teste One Way-ANOVA $p = 0,014$; Teste Tukey $p = 0,047$), indicando citotoxicidade.

Tabela 1. Fases da mitose e índice mitótico observados em células de *Allium cepa* expostas a amostras coletadas em corpos d'água a montante de Estações de Tratamento de Esgoto.

	Intérfase	Prófase	Prometáfase	Metáfase	Anáfase	Telófase	Células em divisão	IM (%)
Controle	1.820	88	38	24	28	2	180	9,0
Alagado	1.850	62	46	20	22	0	150	7,5
Brazlândia	1.866	40	48	20	26	0	134	6,7
BSB Norte	1.796	98	58	10	38	0	204	10,2
BSB Sul	1.772	98	58	28	42	2	228	11,4
Gama	1.896	58	28	10	4	4	104	5,2*
Paranoá	1.862	60	28	22	28	0	138	6,9
Planaltina	1.890	60	28	4	18	0	110	5,5
R. das Emas	1.860	30	44	26	40	0	140	7,0
R. Fundo	1.844	76	20	28	30	2	156	7,8
Samambaia	1.922	24	36	4	14	0	78	3,9
S. Sebastião	1.846	72	34	28	20	0	154	7,7
Sobradinho	1.744	36	52	102	66	0	256	12,8
Vale do Amanhecer	1.868	62	32	22	16	0	132	6,6

Fonte: próprio autor

*Índices Mitóticos cujos valores de P obtiveram diferença estatística significativa ($P < 0,05$).

A tabela 2 mostra valores de IM e número de células em diferentes fases do ciclo celular, tanto para o CN, quanto para os 13 pontos a jusante das ETEs.

Tabela 2. Fases da mitose e índice mitótico observados em células de *Allium cepa* expostas a amostras coletadas em corpos d'água a jusante de Estações de Tratamento de Esgoto.

	Intérfase	Prófase	Prometáfase	Metáfase	Anáfase	Telófase	Células em divisão	IM (%)
Controle	1.820	88	38	24	28	2	180	9,0
Alagado	1.862	44	42	32	20	0	138	6,9
Brazlândia	1.866	28	46	42	18	0	134	6,7
BSB Norte	1.876	72	20	22	10	0	124	6,2
BSB Sul	1.876	64	28	24	8	0	124	6,2
Gama	1.916	42	20	18	4	0	84	4,2*
Paranoá	1.884	58	20	26	12	0	116	5,8
Planaltina	1.912	52	12	8	16	0	88	4,4
R. das Emas	1.958	4	6	10	22	0	42	2,1*
R. Fundo	1.866	66	28	14	26	0	134	6,7
Samambaia	1.924	22	32	12	10	0	76	3,8*
S. Sebastião	1.912	30	18	14	26	0	88	4,4
Sobradinho	1.916	12	20	28	24	0	84	4,2
Vale do Amanhecer	1.888	52	34	12	14	0	112	5,6*

Fonte: próprio autor

*Índices Mitóticos cujos valores de P obtiveram diferença estatística significativa ($P < 0,05$).

Foi observada diferença estatística significativa nos IMs de amostras de água obtidas a jusante das ETEs Gama (Teste One Way-ANOVA $p = 0,014$; Teste Tukey $p = 0,015$), Recanto das Emas (Teste One Way-ANOVA $p = 0,007$; Teste Tukey $p = 0,006$), Samambaia (Teste Kruskal-Wallis $p = 0,013$; Teste Tukey $p < 0,05$), e Vale do Amanhecer (Teste One Way-ANOVA $p = 0,036$; Teste Tukey $p = 0,033$), quando feita comparação com o CN, indicando citotoxicidade presente nessas amostras.

No teste de citotoxicidade, o IM é o principal parâmetro avaliado, sendo efetivo para monitorar a toxicidade de uma ampla gama de agentes. Valores de IM significativamente baixos em relação ao grupo controle negativo, indicam efeitos citotóxicos, ao passo que altos IMs em relação ao grupo CN indicam divisão celular acelerada, processo que pode causar o surgimento de tumores (Leme e Marin-Morales, 2009).

Efeitos subletais são observados em organismos testes, cujo IM se encontra inferior a 50% do CN, enquanto um IM abaixo de 22% em relação ao CN causa efeitos letais (Smaka-Kincl, 1996). No presente estudo, as ETEs cujos valores de p para o IM apresentaram significância, tiveram o IM inferior ao CN em 58% e 47% (montante e jusante da ETE Gama, respectivamente), 62% (jusante da ETE Vale do Amanhecer), 42% (jusante da ETE Samambaia) e 23% (jusante da ETE Recanto das Emas).

Testes realizados com *A. cepa*, exposta a amostras coletadas ao decorrer do rio Drava, na cidade de Maribor, na Eslovênia, revelaram índice mitótico baixo em relação ao CN, o que indica possível citotoxicidade presente no ambiente testado (Smaka-Kincl, 1996). Outro estudo realizado na região da Eslovênia, coletou amostras ao longo do rio Sava (que também atravessa a Croácia e Sérvia), encontrando citotoxicidade em alguns pontos do ecossistema testado (RADIC, 2010).

No cenário do Distrito Federal, um trabalho utilizando *A. cepa* avaliou a genotoxicidade em amostras coletadas nas diferentes etapas do tratamento de esgoto doméstico, cujo produto final é despejado no Lago Paranoá, nessa ocasião, os resultados dos IMs apresentaram valores menores em relação ao controle negativo, suficientes para se obter diferença estatística significativa, para as concentrações mais altas dos estágios dois e três do tratamento (Grisolia, 2005).

No atual trabalho, os valores de IM ajudaram a avaliar a qualidade da água em termos de citotoxicidade para 13 ETEs do DF, tanto a montante, onde apenas uma ETE (Gama) apresentou citotoxicidade, quanto a jusante, onde quatro ETEs (Gama, Recanto das Emas, Samambaia e Vale do Amanhecer) revelaram citotoxicidade,

sendo que o jusante da ETE Recanto das Emas demonstrou um IM de 2,1% (23% abaixo do IM do CN), encontrando-se como a ETE que apresentou a maior citotoxicidade, aproximando-se do nível letal de 22% (Smaka-Kincl, 1996).

Além das comparações entre o CN e os pontos analisados, também foi realizada uma comparação entre os pontos montante e jusante de cada ETE (tabela 3). Houve casos onde ocorreram diferenças estatísticas significantes entre os grupos montante e jusante, o que sugere uma possível ação dos efluentes despejados nesses corpos d'água. As ETEs onde essas diferenças foram observadas são: BSB Norte (Teste One Way-ANOVA $p = 0,046$; Teste Tukey $p = 0,042$), BSB Sul (Teste One Way-ANOVA $p = 0,017$; Teste Tukey $p = 0,013$), Recanto das Emas (Teste One Way-ANOVA $p = 0,007$; Teste Tukey $p = 0,037$).

Tabela 3 - ETEs cujos valores de P obtiveram diferença estatística significativa ($P < 0,05$) para os testes One Way ANOVA ou Kruskal-Wallis e teste Tukey, durante o teste de citotoxicidade em *Allium cepa*.

	Teste Kruskal-Wallis	One Way ANOVA	Teste Tukey (Controle vs. Montante)	Teste Tukey (Controle vs. Jusante)	Teste Tukey (Montante vs. Jusante)
BSB Norte	-	$P = 0,046$	-	-	$P = 0,042$
BSB Sul	-	$P = 0,017$	-	-	$P = 0,013$
Gama	-	$P = 0,014$	$P = 0,047$	$P = 0,015$	-
Recanto das Emas	-	$P = 0,007$	-	$P = 0,006$	$P = 0,037$
Samambaia	$P = 0,013$	-	-	$P < 0,05$	-
Vale do Amanhecer	-	$P = 0,036$	-	$P = 0,033$	-

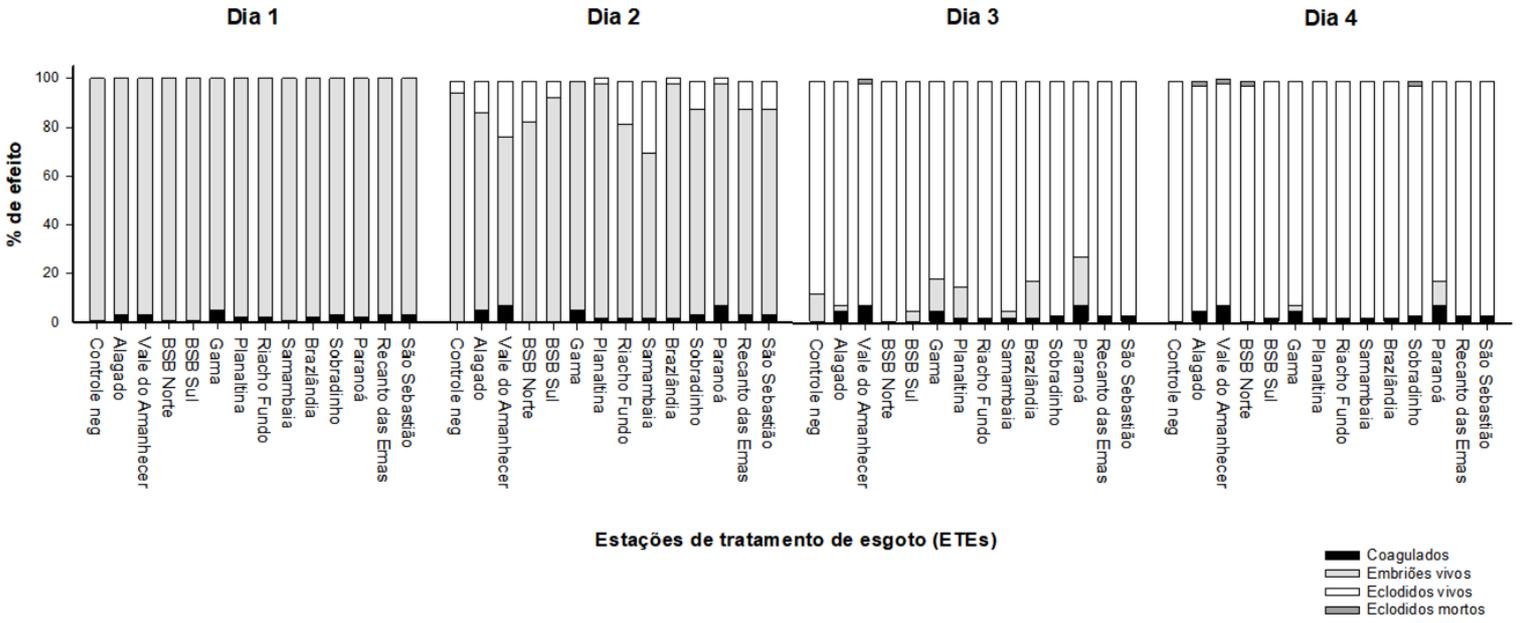
Fonte: próprio autor

Nesse cenário, BSB Norte e BSB Sul apresentaram um IM elevado (10,2% e 11,4%, respectivamente) para os pontos a montante e uma diferença estatística significativa em relação ao IM dos pontos a jusante (6,2% para ambas), o que indica uma redução evidente na atividade celular, possivelmente causada por efluentes despejados por essas ETEs.

É importante ressaltar, que no presente estudo, por questões de logística, para cada ponto analisado foram utilizados dois organismos (*Allium cepa*), onde cada um deu origem a duas lâminas, totalizando quatro lâminas por ponto ($n =$ quatro). Idealmente, cada organismo (*Allium cepa*) sendo considerado um n diferente, é a metodologia mais fiel ao protocolo, apesar disso, os resultados do presente trabalho, considerando cada lâmina um n diferente, foram capazes de fornecer informações relevantes e complementares ao FET.

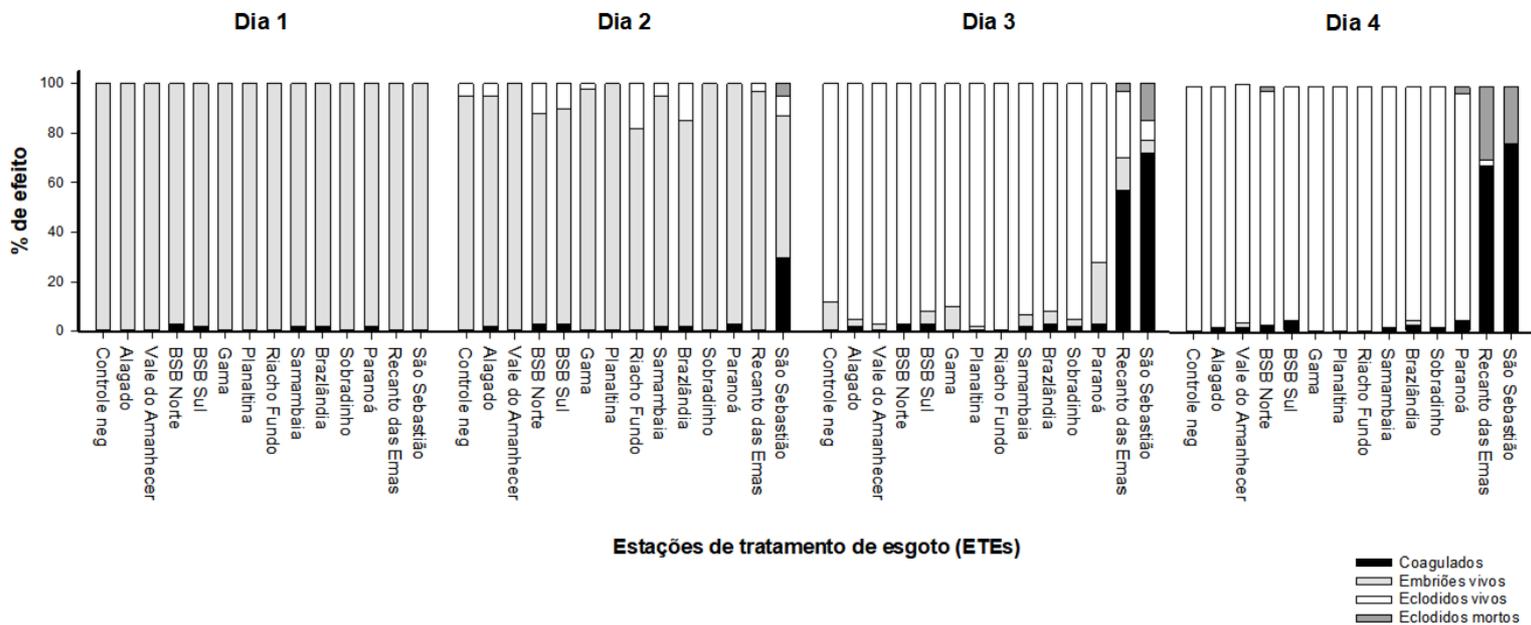
No teste FET, a taxa de mortalidade é um dos principais parâmetros analisados. A figura 4 para amostras de montante e a figura 5 para amostras de jusante, ilustram uma visão geral da análise da taxa de mortalidade realizada em intervalos de 24 a 96 horas, para o controle e para as 13 ETEs avaliadas no FET. Por meio dos gráficos de visão geral é possível observar uma mortalidade acentuada em embriões e larvas expostos a amostras de água a jusante das estações de tratamento Recanto das Emas e São Sebastião, principalmente após 72 e 96 h de exposição.

Figura 4. – Visão geral da porcentagem de mortalidade apresentada por peixes *Danio rerio*, expostos a amostras coletadas a montante de cada Estação de Tratamento de Esgoto, ao decorrer dos dias de experimento.



Fonte: próprio autor

Figura 5. – Visão geral da porcentagem de mortalidade apresentada por peixes *Danio rerio*, expostos a amostras coletadas a jusante de cada Estação de Tratamento de Esgoto, ao decorrer dos dias de experimento.



Fonte: próprio autor

Para avaliar se houve diferença significativa de porcentagem de mortalidade entre os pontos analisados e o CN, foi realizado teste estatístico. Os valores de média e desvio padrão das taxas de mortalidade, para cada dia do experimento e para cada Estação de Tratamento de Esgoto, estão expostos nas tabelas 3 e 4, para montante e jusante, respectivamente.

Os resultados estatísticos indicaram que todos os pontos a montante das ETEs analisadas não diferiram estatisticamente do controle negativo em relação à porcentagem de mortalidade, o que indica que as amostras não são letais para embriões e larvas de peixe-zebra.

Em relação à análise dos pontos a jusante das ETEs, onze dos treze pontos analisados demonstraram não diferir estatisticamente do grupo controle em relação à porcentagem de mortalidade. Houve diferença estatisticamente significativa nos pontos das ETEs Recanto das Emas (72 e 96h) e São Sebastião (48, 72 e 96h), cujos embriões e larvas expostos a amostras coletadas a jusante dessas estações apresentaram mortalidade, sugerindo a indução de toxicidade aguda.

Após 72h de observação das amostras da ETE Recanto das Emas, houve valores estatísticos significantes (Teste Kruskal-Wallis $p = 0,011$; Teste Tukey $p < 0,05$), bem como após 96h (Teste Kruskal-Wallis $p = 0,011$; Teste Tukey $p < 0,05$).

Já para a ETE São Sebastião, as diferenças estatísticas significantes começaram a ser observadas após 48h (Teste One Way-ANOVA $p < 0,001$; Teste Tukey $p = 0,001$), continuando após 72h (Teste One Way-ANOVA $p < 0,001$; Teste Tukey $p < 0,001$) e 96h (Teste Kruskal-Wallis $p = 0,011$; Teste Tukey $p < 0,05$). O teste Tukey teve a função estatística de identificar a origem da diferença significativa, que poderia ocorrer entre os grupos teste (montante e jusante) e ou entre os grupos teste e o CN.

Tabela 4 - Valores de Média e desvio padrão das taxas de mortalidade para amostras coletadas a montante de ETES.

	24h	48h	72h	96h
Controle	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Alagado	0,03 ± 0,02	0,05 ± 8,5E-18	0,05 ± 8,5E-18	0,06 ± 0,02
Brazlândia	0,01 ± 0,02	0,01 ± 0,02	0,01 ± 0,02	0,01 ± 0,02
BSB Norte	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0,01 ± 0,02
BSB Sul	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0,01 ± 0,02
Gama	0,05 ± 8,5E-18	0,05 ± 8,5E-18	0,05 ± 8,5E-18	0,05 ± 8,5E-18
Paranoá	0,01 ± 0,02	0,06 ± 0,07	0,06 ± 0,07	0,06 ± 0,07
Planaltina	0,01 ± 0,02	0,01 ± 0,02	0,01 ± 0,02	0,01 ± 0,02
R. das Emas	0,03 ± 0,02	0,03 ± 0,02	0,03 ± 0,02	0,03 ± 0,02
R. Fundo	0,01 ± 0,02	0,01 ± 0,02	0,01 ± 0,02	0,01 ± 0,02
Samambaia	0 ± 0	0,01 ± 0,02	0,01 ± 0,02	0,01 ± 0,02
S. Sebastião	0,03 ± 0,02	0,03 ± 0,02	0,03 ± 0,02	0,03 ± 0,02
Sobradinho	0,03 ± 0,02	0,03 ± 0,02	0,03 ± 0,02	0,05 ± 0,05
Vale do Amanhecer	0,03 ± 0,05	0,06 ± 0,05	0,08 ± 0,07	0,08 ± 0,07

Fonte: próprio autor

Tabela 5 - Valores de Média e desvio padrão das taxas de mortalidade para amostras coletadas a jusante de ETES.

	24h	48h	72h	96h
Controle	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Alagado	0 ± 0	0,01 ± 0,02	0,01 ± 0,02	0,01 ± 0,02
Brazlândia	0,01 ± 0,02	0,01 ± 0,02	0,03 ± 0,05	0,03 ± 0,05
BSB Norte	0,03 ± 0,02	0,03 ± 0,02	0,03 ± 0,02	0,05 ± 0,05
BSB Sul	0,01 ± 0,02	0,03 ± 0,02	0,03 ± 0,02	0,05 ± 8,5E-18
Gama	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Paranoá	0,01 ± 0,02	0,03 ± 0,02	0,03 ± 0,02	0,08 ± 0,02
Planaltina	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
R. das Emas	0 ± 0	0 ± 0	0,6 ± 0*	0,98 ± 0,02*
R. Fundo	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Samambaia	0,01 ± 0,02	0,01 ± 0,02	0,01 ± 0,02	0,01 ± 0,02
S. Sebastião	0 ± 0	0,35 ± 0,1*	0,86 ± 0,07*	1 ± 0*
Sobradinho	0 ± 0	0 ± 0	0,01 ± 0,02	0,01 ± 0,02
Vale do Amanhecer	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0,01 ± 0,02

Fonte: próprio autor

*Média e desvio padrão nos quais os valores de P obtiveram diferença estatística significativa ($P < 0,05$).

A tabela 6 traz os valores de p para as ETES Recanto das Emas e São Sebastião, referente aos dias de experimento onde diferenças estatísticas foram

observadas, tanto no grupo testado em relação ao grupo controle ou entre os grupos testados (montante x jusante)

Tabela 6 - Valores de P para a média e desvio padrão das taxas de mortalidade para amostras coletadas a jusante de ETEs, que obtiveram diferença estatística significativa ($P < 0,05$) durante o teste FET.

	Tempo de exposição	Teste Kruskal-Wallis	One Way ANOVA	Teste Tukey (Controle vs. Montante)	Teste Tukey (Controle vs. Jusante)	Teste Tukey (Montante vs. Jusante)
Recanto das Emas	72h	P = 0,011	-	-	P < 0,05	-
	96h	P = 0,011	-	-	P < 0,05	-
São Sebastião	48h	-	P < 0,001	-	P = 0,001	P = 0,002
	72h	-	P < 0,001	-	P < 0,001	P < 0,001
	96h	P = 0,011	-	-	P < 0,05	-

Fonte: próprio autor

Inúmeros relatos na literatura mostram a utilização de embriões de peixe-zebra para análise de toxicidade aquática. Thellmann (2014) testou amostras de pontos a montante e a jusante de três ETEs, localizadas nos Rios Schussen, Schmiecha e Eyach, na região Sul da Alemanha. Os embriões expostos a água do Rio Schussen sofreram uma taxa de mortalidade significativamente maior do que o grupo CN. Babić (2017) coletou amostras durante o processamento de efluentes na cidade de Virovitica, Croácia, a ETE em questão serve uma população de cerca de vinte mil habitantes, recebendo resíduos de hospitais e de uma fábrica de açúcar. Na ocasião, foram observados aumentos nas taxas de anormalidades e mortalidade nos embriões expostos.

No Brasil, Kern (2014) observou os efeitos de amostras de águas residuais coletadas de um hospital regional localizado em Santa Cruz do Sul, no estado do Rio Grande do Sul, em peixes-zebra, onde foi observada toxicidade aguda (LC_{50} de 29.25 %). Silva (2015) analisou a toxicidade aguda em amostras de água do Lago Paranoá e efluentes da ETE BSB Sul, as taxas de mortalidade não apresentaram diferenças estatísticas quando comparadas com o CN.

No presente estudo, assim como Silva (2015), também não foi observada mortalidade significativa, para a ETE Sul, em nenhum dos pontos avaliados, apesar dessa ETE atender uma grande variedade de regiões (Asa Sul, Núcleo Bandeirante,

Guará I e II, Cruzeiro/Octogonal/Sudoeste, parte do Lago Sul, Parte do Riacho Fundo, S.I.A., Parte de Águas Claras, Candangolândia, Cidade do Automóvel e Setor de Inflamáveis) (CAESB, 2018).

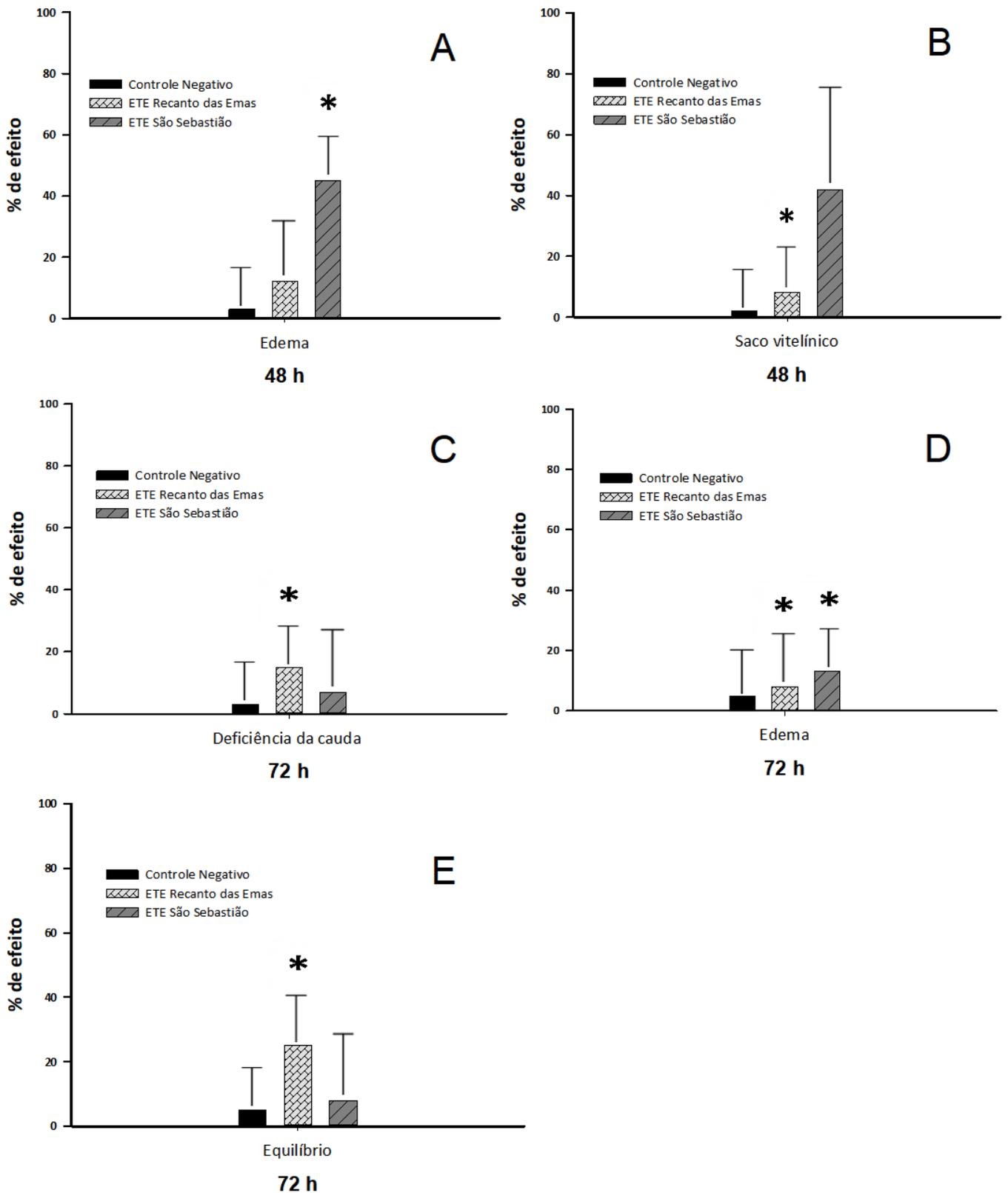
As taxas de mortalidade observadas em pontos a jusante das ETEs Recanto das Emas e São Sebastião e a falta do mesmo nível de mortalidade nos pontos a montante das mesmas estações, mostram que um ou mais elementos que compõe o efluente dessas ETEs causou toxicidade aguda e mortalidade geral nos organismos teste (*Danio rerio*).

Além da análise de mortalidade, os parâmetros subletais também são de grande importância nas análises toxicológicas. No presente trabalho, os efeitos subletais foram analisados estatisticamente. Vale ressaltar que a análise estatística foi realizada apenas para os pontos a jusante das ETEs Recanto das Emas e São Sebastião, pois foram os únicos pontos onde esses efeitos foram aparentes e seguidos por mortalidade generalizada.

A figura 6 contém gráficos representativos dos principais efeitos subletais observados em peixes-zebra expostos a amostras d'água coletadas nos pontos a jusante das ETEs Recanto das Emas e São Sebastião. Os efeitos mais aparentes para a ETE Recanto das Emas, foram o prejuízo no equilíbrio e deficiência da cauda. Enquanto na ETE São Sebastião, os principais efeitos subletais foram o surgimento de edema e deficiência do saco vitelínico. Entretanto, esses não são os únicos efeitos subletais analisados, deficiência dos olhos, deficiência da notocorda e larvas em capacete, foram alguns parâmetros analisados que tiveram ocorrência, porém não significativa.

Os efeitos subletais cujos valores de p obtiveram diferença estatística significativa, observados em peixes-zebra no ponto jusante da ETE Recanto das Emas, foram a deficiência do saco vitelínico, observada em 48h (Teste One Way-ANOVA $p = 0,011$; Teste Tukey $p = 0,031$ e $p = 0,012$), deficiência da cauda, observada em 72h (Teste One Way-ANOVA $p = 0,036$; Teste Tukey $p = 0,046$), surgimento de edema, observado em 72h (Teste One Way-ANOVA $p = 0,003$; Teste Tukey $p = 0,010$ e $p = 0,004$) e prejuízo no equilíbrio, observado em 72h (Teste One Way-ANOVA $p = 0,018$; Teste Tukey $p = 0,019$ e $p = 0,048$). A tabela 7 ilustra esses valores, incluindo valores de p para a comparação entre montante e jusante.

Figura 6. – Porcentagem dos efeitos subletais apresentados por embriões e larvas de peixes-zebra.



Fonte: próprio autor.

Tabela 7 - Principais efeitos subletais cujos valores de P obtiveram diferença estatística significativa ($P < 0,05$) para os testes One Way ANOVA ou Kruskal-Wallis e teste Tukey, durante o teste FET, realizado com amostras da ETE (Recanto das Emas).

	Teste Kruskal-Wallis	One Way ANOVA	Teste Tukey (Controle vs. Montante)	Teste Tukey (Controle vs. Jusante)	Teste Tukey (Montante vs. Jusante)
Dia 3 - Deficiência (cauda)		P = 0,036	-	-	P = 0,046
Dia 3 - Edema		P = 0,003	-	P = 0,010	P = 0,004
Dia 3 - Equilíbrio		P = 0,018	-	P = 0,019	P = 0,048
Dia 2 - Saco vitelínico		P = 0,011	-	P = 0,031	P = 0,012

Fonte: próprio autor

O efeito subletal cujo valor de p obteve diferença estatística significativa, observado em peixes-zebra no ponto jusante da ETE São Sebastião, foi o surgimento de edema, observado em 48h (Teste One Way-ANOVA $p = 0,011$; Teste Tukey $p = 0,020$ e $p = 0,016$) e em 72h (Teste Kruskal-Wallis $p = 0,004$; Teste Tukey $p < 0,05$). A tabela 8 ilustra esses valores, incluindo valores de p para a comparação entre montante e jusante.

Tabela 8 - Principais efeitos subletais cujos valores de P obtiveram diferença estatística significativa ($P < 0,05$) para os testes One Way ANOVA ou Kruskal-Wallis e teste Tukey, durante o teste FET, realizado com amostras da ETE (São Sebastião).

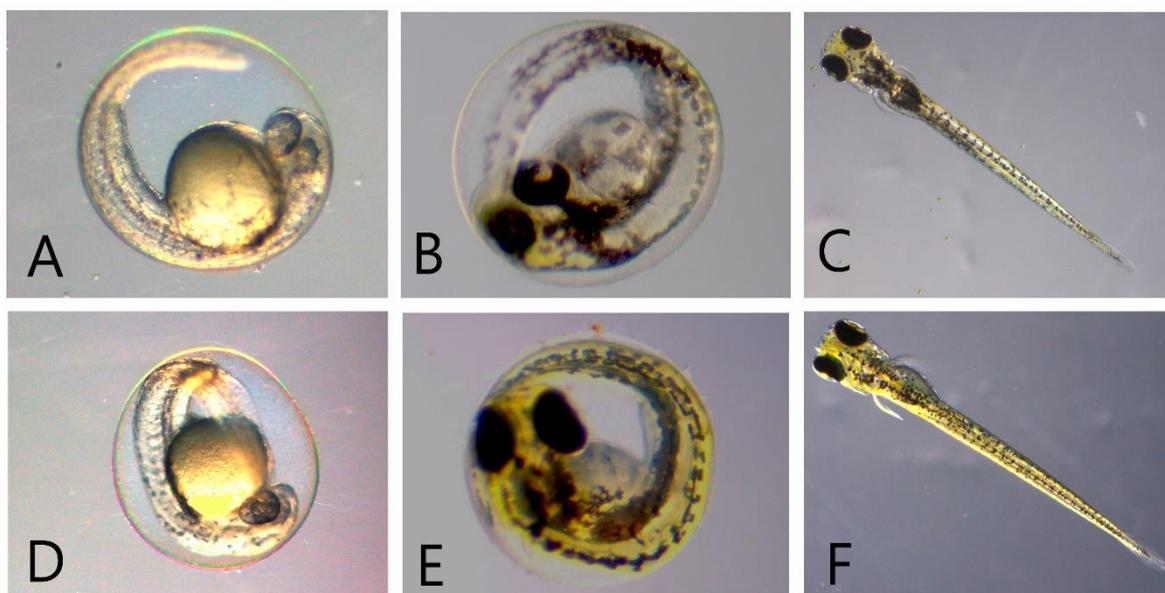
	Teste Kruskal-Wallis	One Way ANOVA	Teste Tukey (Controle vs. Montante)	Teste Tukey (Controle vs. Jusante)	Teste Tukey (Montante vs. Jusante)
Dia 2 - Edema	-	P = 0,011	-	P = 0,020	P = 0,016
Dia 3 - Edema	P = 0,004	-	-	-	P < 0,05

Fonte: próprio autor

Através do método FET, foi possível realizar a observação de efeitos subletais em formas primárias de vida de peixes-zebra, analisando assim, o potencial de amostras de água coletadas a montante e a jusante de ETEs em causar alterações no desenvolvimento.

Na figura 7 estão ilustradas diferentes fases do desenvolvimento de peixes-zebra, expostos ao CN. As imagens mostram desenvolvimento normal e esperado para a espécie, e nas imagens B e E, é possível observar o aumento de pigmentação característico em relação às primeiras 24 horas de experimento.

Figura 7. – Fases primárias de vida de peixes-zebra, expostos ao CN.

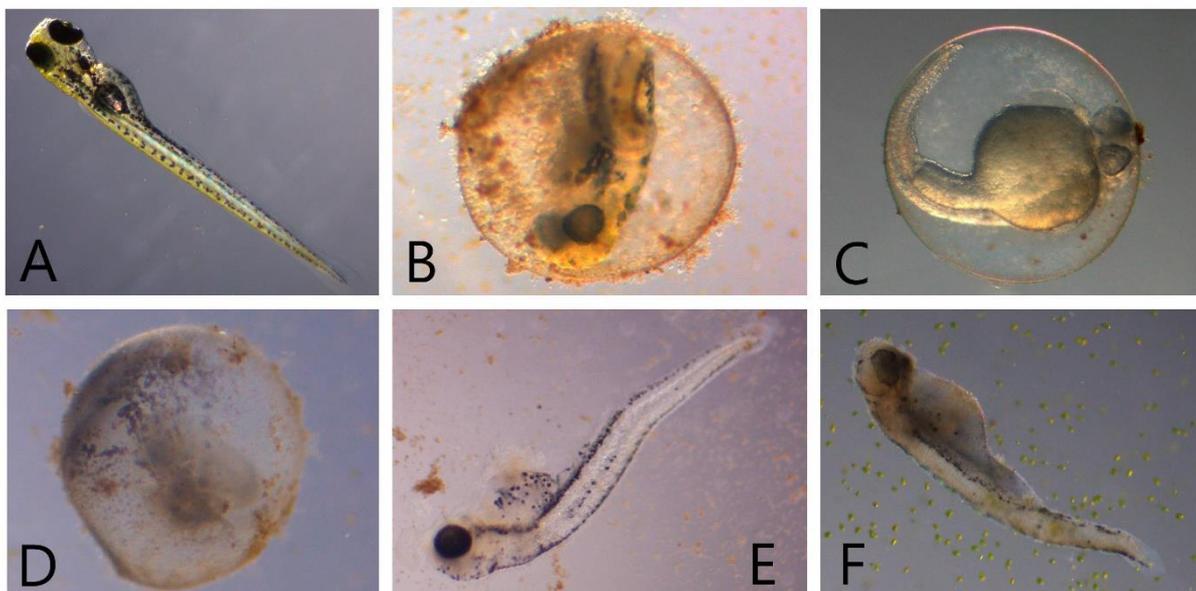


A – Embrião de Peixe-zebra, observação realizada 24 horas após o início do experimento, com aumento de 2x no microscópio estereoscópio. **B** - Embrião de Peixe-zebra, observação realizada 48 horas após o início do experimento, com aumento de 3.2x no microscópio estereoscópio. **C** - Larva de Peixe-zebra, observação realizada 96 horas após o início do experimento, com aumento de 1,6x no microscópio estereoscópio. **D** – Embrião de Peixe-zebra, observação realizada 24 horas após o início do experimento, com aumento de 2x no microscópio estereoscópio. **E** - Embrião de Peixe-zebra, observação realizada 48 horas após o início do experimento, com aumento de 3.2x no microscópio estereoscópio. **F** - Larva de Peixe-zebra, observação realizada 96 horas após o início do experimento, com aumento de 1.6x no microscópio estereoscópio.

Fonte: próprio autor.

A figura 8 traz um exemplo de larva saudável observada em 96h de experimento, referente ao ponto montante da ETE Recanto das Emas (imagem A). O restante das imagens, são referentes ao ponto jusante da própria ETE, trazendo os efeitos subletais e letais observados em peixes-zebra. A imagem B mostra desenvolvimento anormal de embrião de peixe-zebra, com edema e deformidades na cauda e no saco vitelínico. A imagem C traz um embrião com desenvolvimento anormal (deformidade no saco vitelínico). A imagem D traz um embrião morto, fato que foi generalizado por todas as placas dessa estação. Por último, as imagens E e F mostram larvas mortas, outro fato que teve grande ocorrência por todas as placas dessa ETE, ao todo a taxa de mortalidade da placa foi de 98%.

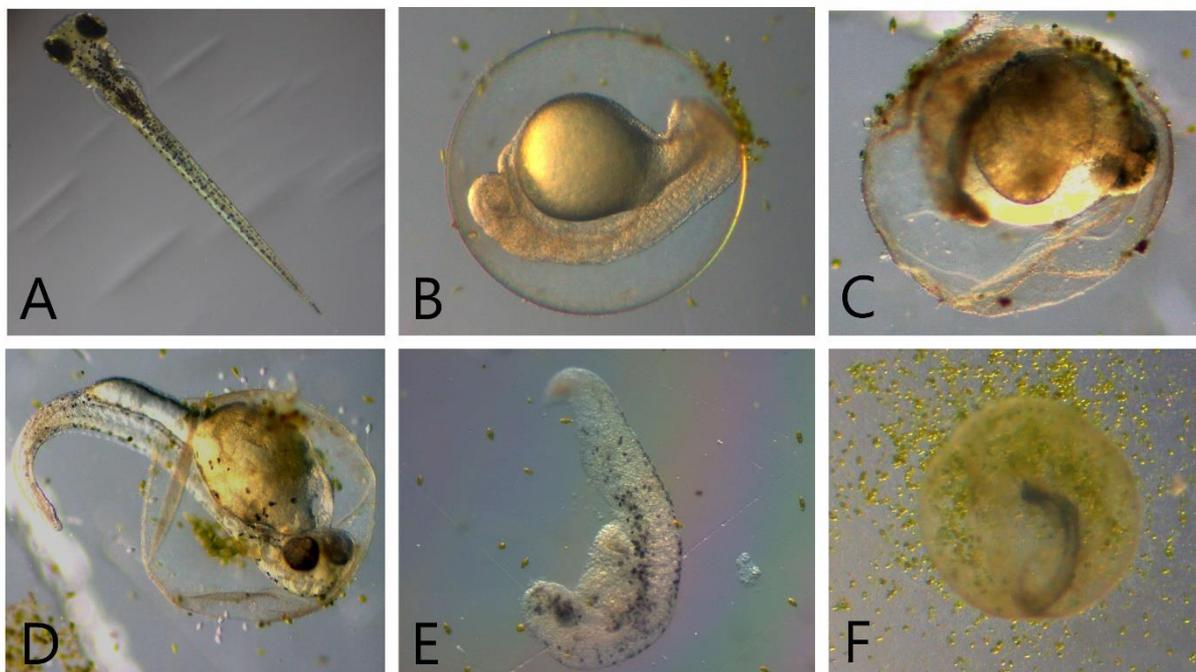
Figura 8. – Fases primárias de vida de peixes-zebra, expostos a amostras de água coletadas a montante e a jusante da ETE Recanto das Emas.



A – Larva de Peixe-zebra exposta a amostra coletada a montante, observação realizada 96 horas após o início do experimento, com aumento de 2x no microscópio estereoscópio. **B** – Embrião de Peixe-zebra exposto a amostra coletada a jusante, observação realizada 48 horas após o início do experimento, com aumento de 4x no microscópio estereoscópio. **C** – Embrião de Peixe-zebra exposto a amostra coletada a jusante, observação realizada 24 horas após o início do experimento, com aumento de 2.5x no microscópio estereoscópio. **D** – Observação realizada 72 horas após o início do experimento mostra embrião morto de Peixe-zebra, exposto a amostra coletada a jusante. Aumento de 3.2x no microscópio estereoscópio. **E** – Observação realizada 96 horas após o início do experimento mostra larva morta de Peixe-zebra, exposta a amostra coletada a jusante. Aumento de 2.5x no microscópio estereoscópio. **F** – Observação realizada 96 horas após o início do experimento mostra larva morta de Peixe-zebra, exposta a amostra coletada a jusante. Aumento de 2x no microscópio estereoscópio.
Fonte: próprio autor.

A figura 9 traz um exemplo de larva saudável observada em 96h de experimento, referente ao ponto montante da ETE São Sebastião (imagem A). O restante das imagens, são referentes ao ponto jusante da própria ETE, trazendo os efeitos subletais e letais observados em peixes-zebra. A imagem B mostra um embrião com desenvolvimento anormal, com deformidades na cauda e no olho. A imagem C traz um embrião com desenvolvimento anormal (deformidade no saco vitelínico). Larva de Peixe-zebra em capacete, com deformidade na cauda (imagem D). As imagens E e F trazem, respectivamente, um embrião e uma larva de peixe-zebra mortos, fato que ocorreu com 100% dos organismos teste.

Figura 9. – Fases primárias de vida de peixes-zebra, expostos a amostras de água coletadas a montante e a jusante da ETE São Sebastião.



A – Larva de Peixe-zebra exposta a amostra coletada a montante, observação realizada 96 horas após o início do experimento, com aumento de 2x no microscópio estereoscópio. **B** – Embrião de Peixe-zebra exposto a amostra coletada a jusante, observação realizada 24 horas após o início do experimento, com aumento de 3.2x no microscópio estereoscópio. **C** – Embrião de Peixe-zebra exposto a amostra coletada a jusante, observação realizada 48 horas após o início do experimento, com aumento de 3.2x no microscópio estereoscópio. **D** – Na amostra coletada a jusante, observação realizada 48 horas após o início do experimento mostra larva de Peixe-zebra em capacete. Aumento de 3.2x no microscópio estereoscópio. **E** – Observação realizada 48 horas após o início do experimento mostra larva morta de Peixe-zebra, exposta a amostra coletada a jusante. Aumento de 4x no microscópio estereoscópio. **F** - Observação realizada 96 horas após o início do experimento mostra embrião morto de Peixe-zebra, exposto a amostra coletada a jusante. Aumento de 2x no microscópio estereoscópio.
Fonte: próprio autor.

Fica evidente que durante os experimentos, duas ETEs chamaram a atenção, São Sebastião e principalmente Recanto das Emas (cujos valores de p foram estatisticamente significantes para todos os testes aplicados). Durante o PDSB, foi relatada a necessidade de mudança no tratamento aplicado pela ETE São Sebastião, pois vários parâmetros de avaliação não correspondiam com o preconizado pela Resolução nº 357, de 17 de março de 2005 da CONAMA, para o enquadramento do corpo d'água rio São Bartolomeu (que recebe os efluentes tratados pela ETE) na classe 3. Já a ETE Recanto das Emas, recebia uma carga orgânica bem superior ao planejado para o ano de 2017, as remoções de nitrogênio e coliformes não demonstravam boa eficiência e devido à baixa vazão do córrego Vargem da Benção, todos os parâmetros (exceto o oxigênio dissolvido) se encontravam abaixo do

preconizado para o enquadramento na classe 2 (GDF, 2017).

Assegurar um suprimento de água de qualidade é fundamental, tanto para a saúde pública, quanto para a economia, pois a prevenção de doenças é mais rentável do que o tratamento das mesmas. O correto monitoramento dos corpos d'água, garante o padrão de funcionamento de atividades como a agricultura e pecuária, que são tão importantes para o bem-estar da economia do Brasil. A fiscalização dos corpos d'água ajuda a preservar os ecossistemas que compõe a fauna e a flora do país.

A análise química da água não foi realizada para este presente estudo, devido à questões de logística, portanto, não é possível especificar a(s) substância(s) responsável pela toxicidade observada. No entanto, a utilização de bioindicadores na avaliação de 13 das 15 ETEs do DF, fornece informações valiosas a respeito dos efeitos das amostras em organismos vivos. Tais informações podem levar a reformulação e repaginação dos métodos de tratamento aplicados nas ETEs que foram apontadas como problemáticas através dos testes realizados.

7. CONCLUSÃO

Durante o presente trabalho, três importantes parâmetros para o monitoramento da qualidade da água foram analisados através de bioindicadores, a citotoxicidade em *Allium cepa*, e a letalidade e subletalidade em *Danio rerio*.

Por meio do teste com *Allium cepa*, é possível concluir que existe potencial citotóxico em amostras de água provenientes da ETE Gama (montante e jusante em relação ao CN), Recanto das Emas (jusante em relação ao CN; e entre montante e jusante), Samambaia (jusante em relação ao CN), Vale do Amanhecer (jusante em relação ao CN), BSB Norte (entre montante e jusante) e BSB Sul (entre montante e jusante).

Por meio do FET, é possível concluir que amostras de água coletadas a jusante das ETEs Recanto das Emas e São Sebastião possuem potencial em causar efeitos letais e subletais em *Danio rerio*.

Este trabalho, por detectar através de testes com bioindicadores, uma possível necessidade de revisão e renovação dos métodos de tratamento em duas das 15 ETEs do DF, sendo elas; Recanto das Emas e São Sebastião, contribui para o

monitoramento e avaliação dos corpos d'água que recebem efluentes tratados vindos das ETEs, amparando a necessidade de maior fiscalização para questões de interesses ambientais. Estudos futuros podem ser empregados, a fim de reforçar os achados realizados por esse trabalho.

8. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ANDERSON T. L. et al. **Water Rights, and Water Markets**. Hoover Institution, Stanford, CA, USA. Elsevier, 2013.

BABIC, S. et al. **Embryotoxic and genotoxic effects of sewage effluents in peixe-zebra embryo using multiple endpoint testing**. Water Research. 2017.

BAI X. et al. (2018). **Occurrence, distribution, and seasonality of emerging contaminants in urban watersheds**. Chemosphere, 200, 133–142

BALL, Philip. **Life's Matrix: A Biography of Water, With a new preface**. Califórnia: University of California, 2001.

BAMBINO K., CHU J. **Zebrafish in Toxicology and Environmental Health: Current Topics in Developmental Biology**. Elsevier. Current Topics in Developmental Biology. Volume 124, 2017. Páginas 331-367.

BOLONG, N. et al., 2009. **A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal**. Desalination, 239(1), pp.229–246.

BRASIL. **Decreto Nº 85.878, de 7 de abril de 1981**. Presidência da República. Subchefia para Assuntos Jurídicos, Brasília, 1981. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/Antigos/D85878.htm>. Acessado em 4 de novembro de 2018.

BRASIL. **Portaria Nº- 2.914, de 12 de Dezembro de 2011**. Ministério da Saúde. Diário Oficial da União, Brasília, 2011. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html> Acessado em 4 de novembro de 2018.

BRASIL. **Resolução CONAMA n. 357, de 17 de março de 2005**. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, 18 mar. 2005. Disponível em: <<http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459>>. Acesso em: 13 out. 2018.

BRASIL. **Resolução CONAMA n. 430, de 13 de maio de 2011**. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução n. 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA. Diário Oficial da União, Brasília, 16 mai. 2011. Disponível em: <<http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=646>>. Acesso 13 de outubro de 2018.

CAESB. **Sistemas de esgotamento**. Disponível em <<https://www.caesb.df.gov.br/esgoto/sistemas-de-egotamento.html>>. Acesso em: 13 de outubro de 2018.

CAVALCANTI C. M. P. **Monitoramento comparativo da concentração**

de contaminantes emergentes nos principais mananciais utilizados no Distrito Federal. 97 páginas. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília, Instituto de Química. 2017.

CONSELHO FEDERAL DE FARMÁCIA. **Tratamento de água é de âmbito farmacêutico.** 2014. Disponível em: <<http://www.cff.org.br/noticia.php?id=2294>>. Acesso em: 13 out. 2018.

DEBLONDE, T., COSSU-LEGUILLE, C. & HARTEMANN, P., 2011. **Emerging pollutants in wastewater: a review of the literature.** International journal of hygiene and environmental health, 214, pp.442–448.

DIAS N. S. et al. **O Estudos dos Efeitos Mutagênicos e Citotóxicos do Confrei (Symphytumofficinale) no ciclo celular de *Allium cepa*.** Revista Eletrônica de Farmácia. Goiânia, v. X (3), jul. p. 20-9, 2013.

DIPP V. R. et al. **Neurobehavioral Alterations in Zebrafish Due to Long-Term Exposure to Low Doses of Inorganic Arsenic.** Mary Ann Liebert, Inc. 2018.

FERRER I., THURMAN M. **Analysis of Pharmaceuticals in Drinking Water, Groundwater, Surface Water, and Wastewater.** Universidade do Colorado, Colorado, Estados Unidos. Comprehensive Analytical Chemistry, Vol. 62. Elsevier, 2013.

FISKESJO G. **The Allium test as a standard in environmental monitoring,** Hereditas. Institute of Genetics, University of Lund, Sweden. Hereditas. Volume 102: 99-112. 1985.

Fundação Joaquim Nabuco. Disponível em <<https://www.fundaj.gov.br/index.php/area-de-imprensa/9403-contaminacao-chega-ao-sao-francisco>> Acesso em 10 de junho de 2019.

GDF. **Análise dos dados de qualidade dos pontos de monitoramento localizados à montante e à jusante às Estações de Tratamento de Esgoto – ETEs do Distrito Federal.** Nota Técnica SEI-GDF n.º 4/2019 - ADASA/SRH/COIH. Brasília-DF, 03 de abril de 2019.

GDF. **Plano Distrital de Saneamento Básico e de Gestão Integrada de Resíduos Sólidos.** Governo de Brasília, 2017. Disponível em <http://www.adasa.df.gov.br/images/Produtos-PDSB/Produto_3/1_PDSB_DF_Tomo_IV_Esgoto_Produto_3_FASE_B_0817_R2.pdf> Acesso em 16 de junho de 2019.

GREENPEACE. Disponível em < <https://www.greenpeace.org/usa/global-warming/issues/oil/>> acesso em 16/07/2019.

GRISOLIA, C. K. et al. **Genotoxicity evaluation of domestic sewage in a municipal wastewater treatment plant.** Universidade de Brasília, Instituto de

Ciências Biológicas, Departamento de Genética e Morfologia, Brasília, DF, Brasil. Genet. Mol. Biol. Vol. 28, 2005.

HOFFMAN D. J. et al. **Handbook of ecotoxicology**. 2 Edição, CRC Press LLC, 2003.

HOLT, E. A. & Miller, S. W. (2010) **Bioindicators: Using Organisms to Measure Environmental Impacts**. Nature Education Knowledge 3(10):8

HOWE, K. et al. **The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome**. Nature 2013;496;7446;498-503

KERN, D. I. et al. **Ecotoxicological and Genotoxic Assessment of Hospital Laundry Wastewaters**. Springer Science+Business, Media New York, 2014.

KIMMEL C. B. et al. **Stages of embryonic development of the zebrafish**. Developmental Dynamics. Institute of Neuroscience, University of Oregon, Oregon. Developmental Dynamics, volume 203: 255-310. 1995.

KLIGERMAN D. C. **Gestão ambiental integrada: recursos hídricos, saneamento e saúde**. 318 páginas. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2001.

KOCH T., DENIKE K. **Crediting his critics' concerns: Remaking John Snow's map of Broad Street cholera, 1854**. Elsevier, Social Science & Medicine, volume 69, páginas 1246–1251. 2009.

KUDO A. et al. **Lessons from Minamata mercury pollution, Japan – after a continuous 22 years of observation**. Wal. Sci. Tee, Volume 38, No.7, páginas 187-193. 1998.

LAMMER E. et al. **Is the fish embryotoxicity test (FET) with the zebrafish (*Daniorerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test?** Elsevier. Comparative Biochemistry and Physiology, parte C 149, páginas 196–209, 2009.

LEME D. M., MARIN-MORALES M. A. **Allium cepa test in environmental monitoring: A review on its application**. Elsevier. Mutation Research, volume 682: 71–81, 2009.

LEME D. M., MARIN-MORALES M. A. **Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water—A case study**. Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), 2007.

LIU, Z.-H., KANJO, Y. & MIZUTANI, S., 2009. **Removal mechanisms for endocrine disrupting compounds (EDCs) in wastewater treatment - physical means, biodegradation, and chemical advanced oxidation: a review**. The Science of the total environment, 407(2), pp.731–48.

LONGHIN, S. R. **Estudo da degradação dos antibióticos beta-lactâmicos amoxicilina e ampicilina e avaliação da toxicidade e biodegradabilidade dos seus produtos.** Tese (Programa de Doutorado em Química); Instituto de Química da Universidade de Brasília. Brasília, 2008.

MADDEN J. C. et al. **Strategies for the optimisation of in vivo experiments in accordance with the 3Rs philosophy.** Elsevier. Regulatory Toxicology and Pharmacology, volume 63, páginas 140–154, 2012.

MCLEOD K. S. **Our sense of Snow: the myth of John Snow in medical geography.** Yale University School of Medicine. Social Science & Medicine 50 923-935, 2000.

MCTIC. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. **Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica: Fascículo 1: Introdução Geral.** Brasília. DF. 2016

METCALFE C. D. et al. **Antidepressants and their metabolites in municipal wastewater, and downstream exposure in an urban watershed.** Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 29, No. 1, pp. 79–89, 2010.

NIKINMAA M. **An introduction to aquatic toxicology.** Academic Press, Elsevier, Oxford, 2014.

OECD. **Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. OECD Guidelines For The Testing Of Chemicals Section 2: Effects On Biotic Systems.** Test Publishing, 2013.

RADIC, S. et al. **The Evaluation of Surface Wastewater Genotoxicity Using the *Allium cepa* test.** Science of the Total Environment 408, 2010, 1228-1233.

REJMENT M. et al. **Occurrence of antidepressants – from wastewater to drinkingwater.** Czasopismo Techniczne, v. 2016, n. Środowisko 1-Ś (11) 2016, p. 145-155, 2016.

ROMÃO, A. et al. **Avaliação dos impactos sobre a saúde do desastre da mineração da Vale (Brumadinho, MG).** Nota Técnica. Fundação Oswaldo Cruz, 2019. Disponível em http://www.epsjv.fiocruz.br/sites/default/files/files/relat%C3%B3rio_Brumadinho_impacto_sa%C3%BAde_01_fev_b.pdf Acesso em 10 de junho de 2019.

ROSA D. M. **A evolução das águas do rio Paraíba do Sul.** 266 páginas. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública. São Paulo, 2012.

RUPPENTHAL J. E. **Toxicologia.** Rio Grande do Sul: Colégio Técnico Industrial da Universidade Federal de Santa Maria, 2013.

RUSSELL W. N. S., BURCH R. L. **The Principles of Humane Experimental Technique**. 1959 .Edição especial Methuen & Co. Ltd., Londres. Disponível em: <http://altweb.jhsph.edu/pubs/books/humane_exp/het-toc> acessado em 5 de novembro de 2018.

SEGURA F. R. et al. **Potential risks of the residue from Samarco's mine damburst (Bento Rodrigues, Brazil)**. Elsevier. Environmental Pollution, volume 2018, páginas 813-825, 2016.

SIDDIQUI A. H., TABREZ S., AHMAD M. **Validation of plant based bioassays for the toxicity testing of Indian waters**. Springer. Environ Monit Assess, volume 179: 241–253, 2011.

SILVA L.P., Bosso A.A., Cardoso S.C. **Avaliação da Citotoxicidade da Própolis em Células Meristemáticas de *Allium cepa***. Londrina: UNOPAR, Científica Ciências Exatas e Tecnológicas, v. 9, n.1, p. 67-70, 2010.

SILVA, S. R. **Quantificação de substâncias com atividade estrogênica e caracterização da toxicidade embrionária em peixe-zebra (*Danio rerio*) nos efluentes das Estações de Tratamento de Esgotos Sul e Norte e no Lago Paranoá**. Brasília-DF. Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas. Dissertação de Mestrado, 2015.

SMAKA-KINCL, V. et al. **The evaluation of waste, surface and ground water quality using the Allium test procedure**. Mutat. Res. 368 (1996) 171–179.

SPERLING, M. VON, 2005. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos** 3 ed. UFMG, Belo Horizonte.

SYSTAT, N.D. **Sigmaplot, Systat software**, Inc., San Jose California USA, www.sigmaplot.com.

THELLMANN, P. et al. **Fish embryo tests with *Danio rerio* as a tool to evaluate surface water and sediment quality in rivers influenced by wastewater treatment plants using different treatment Technologies**. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg, 2014.

TOTOWA, N.J. **Cell Cycle Control: Mechanisms and Protocols**. Humana Press Inc. Methods in Molecular Biology, vol. 296.

UNITED STATES GEOLOGICAL SURVEY (USGS). **Contaminants of Emerging Concern in the Environment**. Disponível em: <<http://toxics.usgs.gov/regional/emc/index.html>> acessada em 5 de novembro de 2018.

WIECZERZA, M. et al. **Bioassays as one of the Green Chemistry tools for assessing environmental quality: A review**. Environment International 94, Elsevier, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Guidelines for drinking-water quality**. Geneva, 2011.

ZHICHAO D. et al. **Fish embryo toxicity test, threshold approach, and moribundas approaches to implement 3R principles to the acute fish toxicity test**. *Chemosphere* (2017), doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.08.0

ANEXOS



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 02 de maio de 2019.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado "**ANÁLISE DA QUALIDADE DA ÁGUA DO DF EM REGIÕES DE DESCARGA DE ESTAÇÕES DE TRATAMENTO DE ESGOTO POR MEIO DO USO DE BIOINDICADORES**". Protocolo n.º 28/2019, sob responsabilidade da Professora Mariana Furio Franco Bernardes foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de: *Danio rerio* (2016). A presente aprovação é válida pelo período de: 18/04/2019 a 18/04/2020.



Prof. Dr. Cássio José da Silva
Coordenador da CEUA – UnB



*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.