UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS – RIO CLARO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Avaliação da eficiência do processo de tratamento convencional utilizado em uma ETA e os impactos promovidos pelos seus efluentes sobre os rios receptores

LETÍCIA DE SOUZA GIGECK

Rio Claro – SP
2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS – RIO CLARO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Avaliação da eficiência do processo de tratamento convencional utilizado em uma ETA e os impactos promovidos pelos seus efluentes sobre os rios receptores

Letícia de Souza Gigeck

Orientadora Profª. Drª. Maria Aparecida Marin Morales

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas Biologia Celular e Molecular.

Rio Claro – SP
2022

G459a

Gigeck, Letícia de Souza

Avaliação da eficiência do processo de tratamento convencional utilizado em uma ETA e os impactos promovidos pelos seus efluentes sobre os rios receptores / Letícia de Souza Gigeck. -- Rio Claro, 2022

152 f. : il., tabs., fotos, mapas

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro

Orientadora: Maria Aparecida Marin Morales

1. Poluição Hídrica. 2. Efluentes de ETA. 3. Ensaios Ecotoxicológicos. 4. Cultura de Células. 5. Bioindicadores Vegetais. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

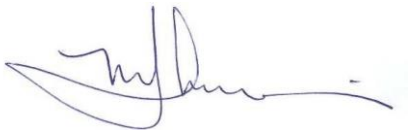
Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Avaliação da eficiência do processo de tratamento convencional utilizado em uma ETA e os impactos promovidos pelos seus efluentes sobre os rios receptores.

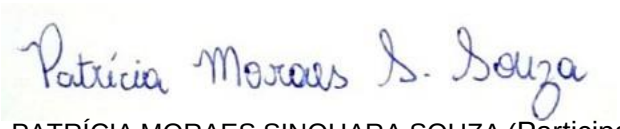
AUTORA: LETICIA DE SOUZA GIGECK
ORIENTADORA: MARIA APARECIDA MARIN MORALES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR), pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. MARIA APARECIDA MARIN MORALES (Participação Virtual)
Departamento de Biologia Geral e Aplicada / IB Rio Claro

Profa. Dra. LAÍS ROBERTA DEROLDO SOMMAGGIO (Participação Virtual)



Profa. Dra. PATRÍCIA MORAES SINOHARA SOUZA (Participação Virtual)

Rio Claro, 31 de maio de 2022

AGRADECIMENTOS

Acredito que não sou muito boa em expressar os meus sentimentos, mas eu preciso agradecer algumas pessoas que foram extremamente importantes para que eu conseguisse concluir mais essa etapa.

Primeiramente gostaria de agradecer aos meus pais, Vander e Laurindo, por terem me incentivado e apoiado desde o início da graduação e terem me dado um grande suporte durante todo o Mestrado. Ao meu namorado Bruno pelo companheirismo, ajuda e paciência durante esse período.

A Professora Drª Maria Aparecida Marin Morales, por ter me recebido no grupo de pesquisa desde a iniciação científica até agora no Mestrado. Agradeço pela paciência, por todos os ensinamentos, conversas, carinho e dedicação na preparação e execução deste projeto.

Preciso agradecer imensamente a Adriana por ter me ajudado durante toda a execução desse projeto, pelos ensinamentos, ter me ajudado em muitas coisas e por todo o suporte para que eu chegasse até aqui. Também preciso agradecer a Laís e a Letícia Rocha por todos os conselhos, ensinamentos, apoio e contribuições para a execução desse projeto.

Tenho que agradecer aos meus amigos e colegas mutagênicos: Letícia Gonçalves, Letícia Rosa, Matheus Gonçalves, Ana Paula, Giovana, Gabriel, Kemellyn, Gabrielly, Nádia, Cleiton, Michele, Maria Tereza, Raquel, Franco pelo convívio mais que especial, convivência, conselhos e momentos maravilhosos que compartilhamos juntos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

"A grandeza não está em ser forte, mas no uso correto da força. Grande é aquele cuja força conquista mais corações pela atração do próprio coração".

Filme Extraordinário

RESUMO

Os recursos hídricos vêm sofrendo diferentes ameaças, a contaminação por uma infinidade de compostos com potencial tóxico. Assim, antes da água ser distribuída para a população, a água bruta precisa ser submetida a um processo de tratamento realizado pelas Estações de Tratamento de Água (ETA). As ETA utilizam etapas, os quais são utilizados compostos químicos, realizados os processos de filtração e desinfecção, para assegurar a qualidade da água a ser distribuída para a população. Contudo, durante o tratamento da água bruta, são gerados resíduos advindos da lavagem dos filtros e dos decantadores, que devem ser tratados, antes de serem descartados em recursos hídricos. A ETA localizada no município de Rio Claro (SP) lança seus resíduos sem tratamento prévio no Córrego Santo Antônio, afluente do Ribeirão Claro. Portanto, o presente estudo avaliou a qualidade da água bruta, captada pela ETA, as águas dos corpos hídricos receptores (pós descarte dos efluentes da ETA), da água destinada ao consumidor. A avaliação da qualidade das águas dos pontos analisados foi baseada em ensaios ecotoxicológicos, e em análises físico-químicos e microbiológicos. Foram realizados ensaios in vivo de fitotoxicidade, com *Lactuca sativa* e de citogenotóxico e potencial mutagênico com o *Allium cepa*; ensaios in vitro de citotoxicidade (MTT); genotóxico (ensaio do Micronúcleo com Bloqueio de Citocinese e ensaio do Cometa) com cultura de células HepG2/C3A. Foram realizadas três amostragens de diferentes pontos (duas no período de seca e uma no chuvoso) nos seguintes pontos: água de captação da ETA (CAP); água do Córrego Santo Antônio sem o lançamento do efluente da ETA (SAS); água do Córrego Santo Antônio com o lançamento do efluente da ETA (SAE); amostra a montante do recebimento do efluente da ETA no Ribeirão Claro; (RCM); amostra a jusante do lançamento do efluente da ETA coletada no Ribeirão Claro no ponto de mistura completa (RCJ); água do cavalete do consumidor (AAP). No Córrego Santo Antônio foram observados elevados níveis de pH e condutividade, baixa concentração de oxigênio, aumento da turbidez e salinidade, elevação da concentração de nitrogênio total, elevado valor de DBO, uma maior presença de coliformes totais e *Escherichia coli*. Nenhuma das amostras de água foram fitotóxicas para o *L. sativa*, com exceção da RCM, para a primeira coleta. A amostra APP foi genotóxica para *A. cepa*, para a primeira e as amostras SAS, RCM, RCJ e APP para a terceira coleta; todas as amostras foram não citotóxicas para as células HepG2/C3A; o SAS apresentou potencial genotóxico pelo ensaio do Micronúcleo com as células HepG2/C3A na segunda e terceira coleta. O Córrego Santo Antônio mostrou ser extremamente vulnerável a ação antrópica e pelo lançamento do efluente da

ETA. O Ribeirão Claro não foi afetado drasticamente pelo lançamento do resíduo da ETA. A água de abastecimento público ficou dentro da maioria dos padrões físico-químicos estabelecidos pela legislação, sendo que o flúor ficou um pouco abaixo da legislação, na primeira coleta. O APP também apresentou potencial genotóxico, na segunda coleta, para o ensaio do Micronúcleo e na primeira coleta no ensaio do Cometa. Assim, o processo de tratamento da água não se mostrou eficiente, e apresentou um potencial genotóxico, provavelmente, relacionado com a formação de subprodutos da desinfecção por cloro.

Palavras-chaves: poluição hídrica; efluentes de ETA; ensaios ecotoxicológicos; cultura de células; bioindicadores vegetais

ABSTRACT

The water resources come suffering different threats, contamination by an infinity of toxic potential compounds. Therefore, before the water is distributed by the population the raw water needs to be submitted to a process for treatment realized by Water Treatment Plants (WTP). The WTP uses stages that involve chemic compounds, filtration, and disinfection process of water to ensure the quality of the water distributed to the population. But during the process, wastes are generated from washing filters and decanters that need to be treated without are lanch water resources. The WTP from Rio Claro (SP) city releases its wastes without previous treatment in the Córrego Santo Antônio, affluent of Ribeirão Claro. Therefore, the present study test the quality of the raw water, captured by WTP, water from water resources (after receiving the waste from WTP), as well as water destined for the consumer. The assessment of the quality of water at the points are based on ecotoxicology assays, physical-chemical test, and microbiologic assays. The following bioassay were conducted *in vivo* phytotoxicity assay with *Lactuca sativa*, a potential cytogenotoxic and mutagenic assay with *Allium cepa*; *in vitro* cytotoxic assay (MTT), and a genotoxic assay (Micronucleus Cytokinesis Block Assay and Comet Assay) with HepG2/C3A cell culture. Three sample collections were carried out (two in the dry season and one in the rainy season) on the following points: WTP captured water (CAP); water from Córrego Santo Antônio without WTP waste (SAS); water from Córrego Santo Antônio with WTP waste (SAE); sample upstream of the receipt of WTP waste in Ribeirão Claro (RCM); sample downstream of WTP waste release collected in Ribeirão Claro at the complete mixing point (RCJ); water from the consumer's easel (AAP). In Santo Antônio stream it was observed high levels of pH and conductivity, low concentration of oxygen, high turbidity and salinity, high concentration of total nitrogen, high level of BOD, and a greater presence of total coliforms and *Escherichia coli*. None of the samples were phytotoxic to *L. sativa,* except RCM in the first collection. The sample AAP showed genotoxic potential for *A. cepa* in the first collection, and the samples SAS, RCM, RCJ, and AAP for the third collection; all the samples weren’t cytotoxic for HepG2/C3A cells culture; SAS showed a genotoxic potential for Micronucleus Assay with HepG2/C3A cells culture. The Córrego Santo Antônio is extremely vulnerable to anthropic action and the release of waste of WTP. Ribeirão Claro wasn't drastically affected by waste from WTP. The public supply of water was within most of the physical-chemical standards established by the legislation. The AAP showed genotoxic potential in the second collection for the Micronucleus assay and in the first collection for the Comet Assay. Thus, the water treatment process wasn't efficient and the

public supply of water presented a genotoxic potential related to the formation of chlorine disinfection by-products

Key-words: water pollution; WTP waste; ecotoxicological tests; cell culture; plant bioindicators

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema ilustrativo do tratamento de água adotado pela Estação de Tratamento de Água da cidade de Rio Claro 37

Figura 2: Imagens dos pontos das coletas de água nas diferentes estações 48

Figura 3: Esquema ilustrativo da localização dos pontos de coleta das amostras 49

Figura 4: Localização geográfica dos pontos de coleta 50

Artigo 1

Figura 1: Esquema ilustrativo dos pontos de coleta 69

Figura 2: Alterações cromossômicas observadas em células meristemáticas de *Allium cepa*, após exposição das sementes às amostras de água coletadas em rios que sofrem influência da atividade da ETA, bem como da água destinada ao abastecimento público da cidade de Rio Claro-SP 100

Artigo 2

Figura 1: Esquema ilustrativo dos pontos de coleta 115

Figura 2: Imagens das alterações do Ensaio do Micronúcleo com Bloqueio de Citocinese com as células HepG2/C3A, expostas às amostras de águas de coleta dos rios sob a influência do descarte do efluente da ETA de Rio Claro 125

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Etapas do tratamento da água bruta realizado nas ETA 33

Artigo 1

Tabela 1: Dados mensais de precipitação, em mm^3, dos anos de 2019, 2020 e 2021 70

Tabela 2: Dados obtidos com a sonda multiparâmetro Horiba ®, para os parâmetros de temperatura, pH, condutividade e oxigênio dissolvido, turbidez, sólidos totais dissolvidos (S.T.D.) e salinidade 74

Tabela 3: Resultados de fluoreto, fosfato, nitrogênio total, DBO e DQO 82

Tabela 4: Resultados de coliformes totais, *Escherichia coli*, bactérias heterotróficas e fungos, para as três amostragens realizadas 87

Tabela 5: Índice (em porcentagem) de germinação de amostras de águas coletadas em rios que sofrem influência da atividade da ETA, bem como da água destinada ao abastecimento público da cidade de Rio Claro-SP, por meio de ensaios realizados com o bioindicador de *Lactuca sativa* (alface) 92

Tabela 6: Avaliação da citotoxicidade (Índice Mitótico), genotoxicidade (Índice de Genotoxicidade) e potencial mutagênico (Índice de Mutagenicidade) de amostras de águas coletadas em rios que sofrem influência da atividade da ETA, bem como da água destinada ao abastecimento público da cidade de Rio Claro-SP, por meio de ensaios com o bioindicador *Allium cepa* 94

Artigo 2

Tabela 1: Resultados do ensaio do MTT das três coletas realizadas 122

Tabela 2: Resultados da avaliação do potencial genotóxico das amostras de água de captação (Ribeirão Claro), do córrego Santo Antônio e do Ribeirão Claro (montante e jusante) e da água de abastecimento público pelo Ensaio do Micronúcleo com Bloqueio

de Citocinese, com cultura de células HepG2/C3A 124

Tabela 3: Resultados de citotoxicidade obtidos com o Índice do CBPI no Ensaio do Micronúcleo com Bloqueio de Citocinese com cultura de células HepG2/C3A 126

Tabela 4: Resultados obtidos para a análise do potencial genotóxico, pelo Ensaio do Cometa (intensidade da cauda), realizado com amostras de água do período seco 129

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ETA – Estação de Tratamento de Água

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

UFC – Unidades Formadoras de Colônias

NTU - Unidade Nefelométrica de Turbidez

STD – Sólidos Totais Dissolvidos

DBO – Demanda Bioquímica de Oxigênio

DQO – Demanda Química de Oxigênio

OD – Oxigênio Dissolvido

CN – Controle Negativo

CAP – Amostra da água de captação do Ribeirão Claro coletada na ETA

SAS – Amostra de água do Córrego Santo Antônio sem o efluente da ETA

SAE – Amostra de água do Córrego Santo Antônio com o efluente da ETA, antes da confluência com o Ribeirão Claro

RCM – Amostra da água do Ribeirão Claro a montante do recebimento do efluente da ETA

RCJ – Amostra a jusante do lançamento do efluente da ETA, coletada no Ribeirão Claro no ponto de mistura completa

AAP – Amostra de água do cavalete do consumidor (água de abastecimento público)

CP – Controle Positivo

MMS – Metil metano sulfonato

IM – Índice Mitótico

IG – Índice de Genotoxicidade

IMut – Índice de Mutagenicidade

MTT – 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio

DMSO – dimetilsulfóxido

LMP – Agarose de baixo ponto de fusão

PBS – tampão fosfato salino

MN – Ensaio do Micronúcleo com Bloqueio de Citocinese

TI – Tail intensity

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 18

2. REVISÃO DA LITERATURA 21

2.1 Legislação Brasileira para o Gerenciamento de Recursos Hídricos e Potabilidade da Água de Abastecimento Público 21

2.2 Estações de Tratamento de Água (ETA) 24

2.3 Etapas do tratamento de água 25

2.3.1 Pré-cloração 25

2.3.2 Coagulação 26

2.3.3 Floculação 28

2.3.4 Decantação 28

2.3.5 Filtração 29

2.3.6 Desinfecção 30

2.3.7 Fluoretação 32

2.4 Resíduos Produzidos pelas ETA 34

2.5 Estação de Tratamento de Água Estudada 35

2.6 Biomonitoramento para avaliação ambiental 37

2.6.1 Bioindicadores Vegetais 38

2.6.2 Cultura de Células HepG2/C3A 41

2 OBJETIVOS 46

3 MATERIAL E MÉTODO 47

3.1 Estação de Tratamento de Água Estudada 47

3.2 Pontos de Coleta 47

3.3 Parâmetros físico-químicos 51

3.4 Ensaio microbiológico 52

3.5 Ensaio com *Lactuca sativa* 53

3.6 Ensaio com *Allium cepa* 54

3.7 Ensaio com cultura de células HepG2/C3A 56

3.7.1 Preparação das amostras para os ensaios com a linhagem celular HepG2/C3A 56

3.7.2 Ensaio do MTT 56

3.7.3 Ensaio de Viabilidade Celular e Ensaio do Cometa.....57

3.7.4 Ensaio do Micronúcleo com Bloqueio de Citocinese (MN).....59

4 Resultados 62

Artigo 1: Impactos físico-químicos, microbiológicos e fitotóxicos causados por efluentes não tratados de Estação de Tratamento de Água, sobre os corpos hídricos receptores 63

Artigo 2: Avaliação dos impactos de efluentes não tratados de Estação de Tratamento de Água (ETA) sobre corpos hídricos receptores, por meio de bioensaios com Células HepG2 / C3A ..110

5 CONCLUSÕES GERAIS 137

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS..... 139

1. INTRODUÇÃO

A água é um recurso extremamente importante para a manutenção da vida da Terra. Portanto, a qualidade dos recursos hídricos está altamente relacionada com a qualidade da vida do planeta. Contudo, algumas atividades humanas têm, sistematicamente, contaminado e poluído os recursos hídricos, cujas consequências vêm sendo danosas à saúde da população e à integridade da biota associada ao local impactado. Assim, é necessário que sejam instituídas, urgentemente, ações que garantam a conservação dos corpos hídricos e, consequentemente, a melhoria da saúde humana. Dentre essas ações, podem ser citadas a utilização de boas práticas de saneamento básico; abastecimento público de qualidade; e práticas de redução de doenças de veiculação hídrica, que promovam a redução da carga de patógenos no meio (BOELEE et al., 2019).

As Estações de Tratamento de Água (ETA) são instalações que realizam o tratamento da água destinada ao consumo humano, ou seja, são as responsáveis por tratar a água bruta de um recurso hídrico, antes da mesma ser distribuída à população. O tratamento da água nas ETA deve atender aos requisitos pré-estabelecidos pela legislação, que garantam a distribuição de água segura e de qualidade para a população. Assim, o processo de tratamento deve remover organismos patogênicos e substâncias tóxicas orgânicas ou inorgânicas presentes na água e reduzir a cor, odor, sabor e turbidez da água de abastecimento público (DE PÁDUA, 2010).

Com o tratamento da água são gerados alguns resíduos dentro das ETA como, por exemplo, os resíduos da limpeza ou descartes de decantadores e da lavagem dos filtros. As características destes resíduos estão relacionadas com a própria característica da água bruta utilizada pela ETA e de outros fatores, como: a concentração de produtos utilizados no tratamento, tempo em que o lodo permanece nos tanques, forma de limpeza dos tanques e eficiência da sedimentação (LUSTOSA et al., 2017). De acordo com Rosario (2007), o método adotado pela ETA depende das características da água do corpo hídrico usado para captação.

No Brasil as ETA foram desenvolvidas com a concepção de que os resíduos gerados nos decantadores, lavagem dos filtros ou tanques de preparação das soluções sejam lançados, diretamente, nos corpos d’água ou em galeria pluvial (ROSARIO, 2007). Essa prática comumente realizada tem recebido críticas, já que podem causar danos à

saúde pública e aos organismos aquáticos. Achon, Barroso e Cordeiro (2004) afirmam que a maioria das ETA brasileiras lançam seus resíduos em corpo d'água, sem que os mesmos passem, previamente, por qualquer tipo de tratamento. Contudo, em fevereiro de 1998, foi promulgada a Lei de nº 9605, que considera crime ambiental o lançamento de resíduos sólidos, líquidos ou gasosos que promovam a poluição ambiental (BRASIL, 1998). Dessa forma, mesmo sendo uma prática recorrente, o descarte dos efluentes das ETA em corpos hídricos, sem tratamento prévio, pode se caracterizar como crime ambiental, dependendo das alterações que esses efluentes promovam no corpo receptor.

A ETA localizada no município de Rio Claro, São Paulo, lança seus resíduos, sem tratamento prévio, em corpos hídricos receptores (Córrego Santo Antônio e Ribeirão Claro). Assim, para avaliar se o descarte destes resíduos representa um potencial tóxico para os corpos receptores, é necessária que sejam realizados estudos que monitorem a qualidade das águas e dos sedimentos dos rios envolvidos, pós recebimento dos efluentes. Uma estratégia interessante para ser aplicada nesta avaliação é a utilização de ensaios específicos que estimem os possíveis efeitos adversos desses efluentes sobre a biota e ao ambiente (VAN STRAALEN, 1998; LI; ZHENG; LIU, 2010).

Para uma avaliação adequada do potencial tóxico de uma substância ou amostra ambiental, é recomendável que sejam realizados alguns testes laboratoriais, utilizando alguns bioindicadores pertencente a níveis tróficos diversos (DE CASTRO, 2013). Dentre as espécies vegetais, a espécie *Lactuca sativa* é um modelo de estudos recomendado por organizações internacionais para a avaliação de fitotoxicidade (LYU et al., 2018) e a espécie *Allium cepa* testes de citotoxicidade e genotoxicidade muito usado em avaliações e monitoramento ambiental. As plantas são bioindicadores interessantes, pois apresentam algumas semelhanças às respostas observadas em mamíferos, com relação a detecção de alterações citogenotóxicas desencadeadas por compostos químicos (LAUGHINGHOUSE et al., 2012).

Além de organismos vegetais, as linhagens celulares são consideradas eficientes modelos *in vitro* para testes que visam avaliar o potencial citotóxico, genotóxico e/ou mutagênico de contaminantes ambientais (PILLON et al., 2005; WESTERINK et al., 2010; MORAIS et al., 2011; LIU et al., 2012).

Frente a isso, foram utilizados diferentes sistemas teste (*L. sativa, A. cepa* e cultura de células HepG2/C3A) para avaliar se os resíduos produzidos na ETA apresentam

potenciais tóxicos para os corpos hídricos receptores (Córrego Santo Antônio e Ribeirão Claro). Além disso, também foi avaliada as condições físico-químicas e microbiológicas dos corpos receptores, bem como a qualidade da água de abastecimento público disponibilizada pela ETA estudada. O presente trabalho trará informações extremamente importantes para o município de Rio Claro, quanto aos impactos que os resíduos da ETA possam promover nos seus corpos hídricos receptores (Córrego Santo Antônio e Ribeirão Claro). Considerando que o Ribeirão Claro é afluente do rio Corumbataí, este estudo contribuirá ainda com informações sobre a possível transferência de contaminantes do Ribeirão Claro para rio Corumbataí, rio esse envolvido com o abastecimento de grande parte da cidade de Piracicaba.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Legislação Brasileira para o Gerenciamento de Recursos Hídricos e Potabilidade da Água de Abastecimento Público

De acordo com a Resolução do CONAMA nº 357 de 2005, as águas doces são classificadas em Classe Especial, Classe I, Classe II, Classe III e Classe IV. Os corpos d'água enquadrados na Classe Especial são aqueles utilizados para o consumo humano que devem ser submetidos, apenas, a processos de desinfecção. Deve haver nesses ambientes a preservação do equilíbrio natural das comunidades aquáticas e à preservação dos ambientes aquáticos em unidades de conservação de proteção integral. Já os de Classe I, também são utilizados para o abastecimento público, sendo que o tratamento adotado deve ser o simplificado, sendo presada a proteção da comunidade aquática. A água doce de Classe I pode ser utilizada para recreação de contato primário, irrigação de hortaliças e à proteção das comunidades aquáticas em área indígena. Os corpos d'água enquadrados na Classe II também são utilizados para o abastecimento público e as águas precisam ser submetidas a um processo de tratamento convencional. Além disso, podem ser destinadas à recreação primária e à irrigação de hortaliças, jardins e campos de esporte/lazer (onde o público entra em contato direto com a água), e à atividade pesqueira. As águas enquadradas como de Classe III também são utilizadas para o abastecimento público, mas precisam ser submetidas a um tratamento convencional ou avançado. Essas águas podem ser destinadas à irrigação, pesca, recreação secundária e dessedentação. Já a corpos d'água enquadrados na classe IV, podem ser destinadas à navegação e paisagismo (BRASIL, 2005). Resumidamente, a água bruta proveniente de corpos d'água enquadrados como de Classe Especial deve ser submetida apenas a processos de desinfecção; a de Classe I por um tratamento simplificado; e a água de corpos d'água enquadrados como de Classe II ou III por processos de tratamento convencional (LIBÂNIO, 2010).

De acordo com Resolução do CONAMA nº 357 de 2005, os rios de Classe II devem seguir alguns padrões físico-químicos e microbiológicos. As águas dessa classe não devem causar efeito tóxico crônico a organismos expostos (critérios estabelecidos por órgãos ambientais ou por outras instituições competentes para essa avaliação). Além disso, esses corpos hídricos não devem apresentar qualquer tipo de espuma, óleos ou substâncias que dão gosto ou sabor à água, bem como corantes ou resíduos sólidos. A avaliação de coliformes termotolerantes deve ser realizada, pelo menos, em 6

amostragens/ano (frequência bimestral), nas quais os coliformes não devem exceder 1000 UFC (Unidades Formadoras de Colônias) por 100 mL, em 80% das amostras. O organismo *Escherichia coli* pode ser um substituto ao coliformes termotolerantes, conforme estabelecido pelo órgão ambiental competente. Além disso, a água pode apresentar pH entre 6,0 a 9,0; ter turbidez de até 100 NTU; DBO de 5 dias a 20 ºC de até 5 mg/L O_2; não deve apresentar OD menor que 6 mg/L O_2; a clorofila A pode estar presente em até 30 ìg/L; a densidade de cianobactérias deve ser de até 50.000 cel/mL ou 5 mm^3/L; e o fosforo total, para ambientes lênticos, deve estar em até 0,03 mg/L, enquanto os intermediários de até 0,05 mg/L.

De acordo com o Artigo 25 da Resolução do CONAMA nº 357 de 2005, qualquer tipo de efluente não deve ser lançado em corpos hídricos, sem antes ser submetido a um processo de tratamento, para que o mesmo não altere as características do corpo hídrico receptor. O Artigo 28 da mesma Resolução (CONAMA 357) dispõe ainda que o efluente não pode promover o desenquadramento do curso d'água onde ele é lançado. A Resolução do CONAMA nº 430 de 2011, em seu Artigo 5 (BRASIL, 2011), traz que o lançamento de efluentes em corpos d'água podem promover o desenquadramento do mesmo, e no seu Artigo 12 também enfatiza que não devem ser alteradas as características do corpo hídrico, quanto à sua classificação, bem como quando a qualidade das suas águas. De acordo com o Artigo 16 dessa mesma Resolução 430, os efluentes de qualquer tipo de fonte poluidora só poderão ser lançados diretamente nos corpos receptores se eles apresentarem as seguintes características: pH estar entre 5 a 9; temperatura menor que 40 ºC (variação de temperatura não pode exceder a 3 ºC no limite da zona mista); até 1 mL/L de materiais sedimentáveis; limite de até 20 mg/L de óleos minerais ou 50 mg/L de óleos vegetais ou gorduras de origem animal; ausência de materiais flutuantes; regime de lançamento com vazão máxima de até 1,5 vez a vazão média do período de atividade diária do agente poluidor, exceto nos casos permitidos pela autoridade competente. Ainda, com relação a Resolução do CONAMA nº 430 de 2011 (BRASIL, 2011), o Artigo 18, que dispõe sobre a toxicidade do efluente para os organismos aquáticos, destaca-se que o efluente não pode causar ou ter potencial tóxico aos organismos aquáticos do corpo receptor. Os critérios de ecotoxicidade devem estar baseados em ensaios ecotoxicológicos de, pelo menos, dois níveis tróficos diferentes.

Com relação a água potável, a Portaria de Consolidação nº 5 de 2017, em seu Anexo XX, que dispõe sobre o controle e a vigilância da qualidade da água destinada ao

abastecimento público, bem como o seu padrão de potabilidade (BRASIL, 2017), a água destinada ao consumo humano deve ser potável, (adequada para ser ingerida, para preparar e produzir alimentos e para a higiene pessoal). Para ser considerada potável, a água precisa atender todos os padrões de potabilidade estabelecidos e não oferecer riscos à saúde humana. O Anexo XX dispõe que a água potável não pode apresentar *Escherichia coli* (indicador de contaminação fecal) e não pode conter coliformes totais, na saída do tratamento (indicador de eficiência do tratamento da água). O anexo ainda dispõe que deve ser realizada a determinação de bactérias heterotróficas do reservatório e rede (indicativo de integridade do sistema de distribuição). Além disso, é recomendado o monitoramento de vírus entéricos nos locais de captação de mananciais superficiais, podendo substituir a avaliação de risco microbiológico. O processo de desinfecção da água (cloração, cloroaminação ou dióxido de cloro) deve respeitar os tempos e valores de concentração residuais do desinfetante, na saída do tanque de contato. Em relação aos parâmetros físico-químicos abordados na Portaria de Consolidação nº 5 de 2017 (BRASIL, 2017), a água destinada ao abastecimento público precisa apresentar um pH entre 6,0 a 9,0; uma turbidez menor que 5 NTU e 1 g de Sólidos Totais Dissolvido (STD).

A Portaria GM/MS nº 888 de 2021 (BRASIL, 2021) faz alterações no Anexo XX da Portaria de Consolidação nº 5 de 2017, em relação aos procedimentos de controle e vigilância da qualidade de água e dos padrões de potabilidade da água destinada ao abastecimento público. O Artigo 29 desta portaria dispõe que deve ser realizado o monitoramento mensal de *Escherichia coli* nos locais de captação da água e, quando necessário (média geométrica móvel nos últimos 12 meses de monitoramento maior ou igual a 1000 / 100 mL), realizar uma avaliação da eficiência do processo de tratamento de água pelo monitoramento de esporos de bactérias aeróbias. Além disso, se a água de captação for submetida por processos de pré-oxidação, deve ser realizado um monitoramento de oocistos de *Cryprosporidium* e *Giardia*, quando a média geométrica de *Escherichia coli* for maior ou igual a 1000 / 100 mL. A portaria de 2021 adicionou também parâmetros importantes para o controle de microcistina e saxitoxinas e atualizou os padrões organolépticos. O padrão de STD foi reduzido para 500 mg/L e manteve a turbidez de 5 NTU. Também foi estabelecido, para um melhor controle da qualidade de água um número mínimo de frequência de amostragens, para as análises bacteriológicas, de cor aparente, pH, turbidez, residual de desinfecção e outros parâmetros das águas superficiais e subterrâneas.

Todos os parâmetros estabelecidos pela legislação são de suma importância para a manutenção do ambiente aquático. Os parâmetros são a base para uma gestão adequada dos recursos hídricos, bem como a garantia da saúde ambiental. Dessa forma, precisam ser, constantemente, revisados e atualizados.

2.2 Estações de Tratamento de Água (ETA)

As estações de tratamento de água têm como objetivo principal a retirada de impurezas, contaminantes ou organismos biológicos da água. As ETA devem transformar a água bruta, que poderia ser inadequada para o consumo humano, em uma água potável, com melhores condições de higiene e saúde da população (ROSARIO, 2007).

A ideia do tratamento de água para o consumo humano é muito antiga. Eram utilizadas técnicas rudimentares como decantação em cisternas ou fervura. Mas, com o estabelecimento de técnicas mais avançadas ao longo dos séculos, devido ao avanço em diferentes áreas do conhecimento, como a medicina, esse tratamento foi sendo aprimorado (CRITTENDEN et al., 2012; REALI; PAZ; DANIEL, 2013).

É possível colocar, em uma linha do tempo, alguns eventos importante relacionados aos tratamentos de água bruta, antes da mesma ser destinada à população: 1804 - foi criada a primeira estação de tratamento de água municipal (Paisley/ Escócia), onde era distribuída água filtrada à população, por meio de carroças; 1835 - Robley Dunlingsen recomendou, em seu livro Public Health, a adição de cloro, para a manutenção da água potável; 1856 - Thomas Hawksley traz a necessidade de sistemas pressurização da água, como estratégia para evitar a possível contaminação externa da mesma; 1893 - foi proposto o primeiro filtro a base de areia (Lawrence- Massachsetts/USA), como alternativa para redução da mortalidade da população; 1897 - Fuller, em com seus estudos com a filtração rápida utilizando areia, descobre a eficiência da coagulação e sedimentação para a remoção de microrganismos da água; 1902 – foi adicionado, além da adição de cloro na água de abastecimento, hipoclorito de cálcio e cloreto férrico, o que promoveu a coagulação e melhor desinfecção da água (Middelkerke/Bélgica); 1906. - foi utilizado ozônio como agente desinfetante (Nice/França); 1911 - Jonhson enfatiza que só a utilização da filtração não era suficiente para a remoção dos microrganismos da água, necessitando de uma desinfecção com cloro; 1974 - estudos holandeses e americanos

alertam para a formação de trihalometanos na água de abastecimento, após a utilização do cloro (CRITTENDEN et al., 2012). Atualmente, existem diversos processos de tratamento de água que são aplicados pelas ETA, os quais serão detalhados a seguir.

A Resolução do CONAMA 357 (BRASIL, 2005) dispõe que a escolha do tratamento a ser utilizado pelas ETA (tratamento simplificado, convencional ou avançado) deve ser específica, sempre seguindo as recomendações de acordo com a classificação dos corpos d'água de captação. O tratamento convencional consiste nos processos de coagulação, floculação, decantação, filtração, desinfecção e fluoretação da água.

De acordo com Libânio (2010), o tipo de tratamento de água a ser utilizado por uma ETA depende de requisitos como: conhecimento das características da água bruta; custos de implantação, manutenção e operação; manuseamento e confiabilidades dos equipamentos; flexibilidade operacional; conhecimento da localização geográfica e características da sociedade e a disposição correta do lodo produzido no processo de tratamento. A água bruta pode impactar a tecnologia adotada pela ETA e, assim, influenciar o seu processo de tratamento, pois se a água bruta não apresentar uma boa qualidade, será necessário, por exemplo, utilizar maiores quantidades de produtos nas etapas de tratamento (SILVA et al., 2012).

2.3 Etapas do tratamento de água

2.3.1 Pré-cloração

A pré-cloração da água tem como finalidade contribuir para sua desinfecção, e também melhorar o procedimento de floculação. A utilização da pré-cloração está relacionada ao controle do crescimento de algas, aumento na coagulação e floculação, degradação de alguns poluentes, eliminação de microrganismos patogênicos e oxidação de substâncias, como a amônia, substâncias orgânicas ou inorgânicas (MA et al., 2012; QI et al., 2016; DIAS; LIBRANTZ; DOS SANTOS, 2020). Parte do cloro utilizado nesta etapa, é consumido nos processos de oxidação e na outra desinfecção (DIAS; LIBRANTZ; DOS SANTOS, 2020). A ETA, foco do presente estudo, realiza o procedimento de pré-cloração, que acontece logo após a chegada da água de captação na estação.

O processo de cloração, como também a cloroaminação, é amplamente utilizado para a desinfecção, por ser considerado eficaz, econômico e por promover a desinfecção residual, dentro do sistema de distribuição (HOW et al., 2017). Tal utilização se dá pelo seu custo, mas também devido ao seu potencial oxidante, o que faz com que ocorra um nível menor de cloro residual no sistema de distribuição e minimize a recontaminação por microrganismos (SADIQ; RODRIGUEZ, 2004).

2.3.2 Coagulação

A coagulação, que é o processo de desestabilização das partículas coloidais presentes na água bruta, e é feita pela adição de substância coagulante à água de captação. A função de desestabilizar as partículas é essencial, pois diminui o caráter repelente das mesmas, e assim possibilita a agregação dos coloides. Após o processo de coagulação, acontece a floculação e, consequentemente a sedimentação dos agregados, permitindo assim a remoção dos mesmos (JIN, 2005; BRATBY, 2016).

A escolha do tipo de coagulante a ser utilizado pela ETA deve levar em consideração as especificidades do tratamento, questões econômicas e propriedades da água a ser tratada (DE PÁDUA, 2010). Dentre os compostos que podem ser utilizados como coagulantes podemos citar os metálicos, como polimerizantes, onde os sais de alumínio ou ferro são os mais utilizados. A eficiência do processo de coagulação e as propriedades dos flocos formados estão relacionadas com as características do coagulante utilizado, tais como as especificações dos compostos hidrolisados, dosagem, ligações químicas estabelecidas e o potencial de reatividade do coagulante (JOHNSON; AMIRTHARAJAH, 1983; JARVIS et al., 2012; SONG et al., 2015; WATANABE, 2017).

Além destes fatores citados, Libânio (2010) destaca ainda que os coagulantes também podem interferir no pH, na alcalinidade, nas características das partículas presentes na água, na uniformidade a aplicação do produto, bem como, na presença, concentração e tempo útil do coagulante utilizado. Já os fatores menos impactados pelo processo de coagulação são a temperatura, gradiente de velocidade de sedimentação das partículas e período de agitação na unidade de mistura rápida.

Os coagulantes são divididos em três categorias, os a base de alumínio (sulfato de alumínio, cloreto de alumínio, aluminato de sódio, cloridrato de alumínio, cloreto de

polialumínio), a base de ferro (sulfato férrico, sulfato ferroso, cloreto férrico, sulfato de cloreto férrico, sulfato poliférrico e sais de ferro com polímeros orgânicos) e os poliméricos (sílica ativada, polímeros naturais ou sintéticos). As duas classes de coagulantes metálicos são mais utilizadas, devido à eficiência no processo de coagulação, à disponibilidade e ao baixo custo. A eficiência dessas substâncias está relacionada com a capacidade dos produtos em formar complexos polinucleares multicarregados. A ETA estudada, utiliza como coagulante o cloreto férrico, que é encontrado em forma líquida ou cristalizada.

A dosagem adequada e ajustada de coagulante influencia no processo de remoção dos sólidos em suspensão da água (JIN, 2005). Como a quantidade de uso do coagulante depende das características da água bruta, se essa água apresentar uma maior presença de matéria orgânica, poderá ser necessário a utilização de quantidades excessivas de coagulantes. Além disso, pode também haver uma maior resistência de coagulação dos flocos e, consequentemente uma menor redução de subprodutos de desinfecção. Esse problema pode ser corrigido por meio de pré-tratamento de troca iônica magnética. Dessa forma, é possível somar outros processos ao processo de coagulação, o que permite a melhoria das propriedades associativas das partículas e a redução significativa de trihalometanos. Porém, esses procedimentos apresentam algumas restrições, como as relacionadas aos custos do processo e às diferentes características das águas de captação (JARVIS et al., 2012).

De acordo com Gilca et al. (2020), o processo de coagulação seguido pela floculação é essencial para a remoção da matéria orgânica presente na água bruta. A coagulação é um processo que facilita a remoção das impurezas, sejam elas de ocorrência natural ou não (SARITHA; SRINIVAS; VUPPALA, 2017). As partículas como argilas, sedimentos, microrganismos, ácidos húmicos e minerais são as responsáveis pela cor e turbidez da água (JIN, 2005). Portanto, após o processo de sedimentação e remoção das impurezas, espera-se que haja remoção de matéria orgânica; de substâncias tóxicas e de substâncias que possam conferir odor e sabor à água; remoção de possíveis microrganismos; redução de precursores de trihalometanos; e redução da turbidez, fatores estes que podem contribuir para uma melhora significativa na qualidade da água (LIBÂNIO, 2010).

2.3.3 Floculação

A floculação é o procedimento onde as partículas suspensas e coloidais presentes na água se matém em flocos, o que reduz a dispersão das mesmas na água. O processo de floculação acontece em um floculador por: 1. colisões e aglomerações entre as partículas; 2. associações entre as partículas e flocos já existentes; 3. colisão entre os flocos existentes. As colisões acontecem por transporte de difusão turbulenta, ao mesmo tempo em que ocorre uma mistura lenta (JIN, 2005; WATANABE, 2017). A agitação neste processo tem por finalidade promover o contato entre as impurezas presentes na água, aumentando o tamanho das partículas (formação dos flocos) (DE PÁDUA, 2010). Os flocos formados serão removidos nos processos de sedimentação/flotação ou nas próprias unidades de filtração (LIBÂNIO, 2010).

O tamanho dos flocos pode influenciar, diretamente, as unidades de separação sólido/líquido. O processo de floculação acontece por três diferentes mecanismos: floculação pericinética, floculação ortocinética e sedimentação diferencial. Na floculação pericinética, as partículas pequenas vão se aglomerando, devido ao movimento Browniano e, à medida que o processo ocorre, vão se formando agregados grandes. Já a floculação ortocinética ou mistura lenta ocorre pela agitação mecânica de baixa velocidade, que formam os aglomerados maiores. As colisões que ocorrem neste momento podem levar a rupturas dos flocos formados, portanto, nesta etapa da floculação ortocinética existe uma dependência entre o gradiente de velocidade e o tempo de floculação. Por último, a sedimentação diferencial é quando os agregados de diferentes velocidades de sedimentação vão se sobrepondo no processo de sedimentação, originando agregados ainda maiores (PAULI, 2020). Ainda de acordo com Pauli (2020), o floculador adotado e instalado em uma ETA influencia o tamanho e a forma dos agregados. Os modelos de floculadores são os hidráulicos e mecanizados, mas a decisão de qual ser adotado, depende das características da água bruta que chega na ETA, do seu custo benefício e das condições de manutenção dos floculadores.

2.3.4 Decantação

O processo de decantação consiste em uma das técnicas mais antigas de tratamento de água, sendo utilizada, primeiramente, apenas para a clarificação da água. Essa técnica

utiliza a gravidade como princípio básico para a sedimentação das impurezas presentes na água de captação (DE PÁDUA, 2010). A sedimentação consiste no processo físico de separação das partículas sólidas em suspensão na água, separação sólido-líquido, resultando assim na redução da turbidez. O processo de sedimentação se dá nos tanques de decantação, também chamados de decantadores (RICHTER, 2009; ZHANG et al., 2021).

A condições de sedimentação dos materiais floculados dependem das características e propriedades dos sólidos promoverem a separação do material particulado (sólidos) do meio líquido. O principal fator de sedimentação é a frequência de colisão das partículas e flocos, juntamente com o tempo de colisão/dose-coagulante utilizado, pH e temperatura do meio (WANG et al., 2018). O processo de sedimentação que acontece nos decantadores é responsável pela remoção tanto das partículas em suspensão e como de alguns contaminantes biológicos. Quanto mais tempo a água permanece nos decantador, maior será a deposição de partículas sólidas no fundo dos mesmos. As características do floco, tais como tamanho e resistência, influenciam diretamente os processos de floculação e sedimentação. Os flocos pequenos são mais difíceis de serem removidos durante o processo de sedimentação, trazendo consequências negativas para a filtração. Já os flocos grandes e densos proporcionam uma maior eficiência na sedimentação e na filtração (ZHANG et al., 2021).

Os decantadores utilizados nos tratamentos da água podem ser de dois topos: os laminares, com fluxo ascendente ou fluxo horizontal, que apresentam módulos ou placas que reduzem a turbulência, ou os convencionais, com fluxo horizontal ou vertical. (CUNHA, 2004). A etapa de sedimentação é um processo de baixo custo que antecede outros métodos de purificação (TAGHIZADEH, 2018).

2.3.5 Filtração

Depois do processo de decantação, a água é submetida ao processo de filtração. A filtração consiste na passagem da água já submetida aos tratamentos anteriores por um agente filtrante, para a remoção de impurezas, flocos e outras partículas. Esta etapa é considerada uma das mais importantes do processo e tratamento, pois é nesse momento que são corrigidos os erros cometidos nas etapas anteriores (coagulação, floculação e

decantação) (LIBÂNIO, 2010; CLARK, 2011) e removidas as partículas e microrganismos que ainda estão presentes na água (JIN, 2005). Essa remoção da carga microbiológica auxilia também para a melhoria da eficiência do processo de desinfecção. É na etapa da filtração que são estabelecidos os parâmetros de potabilidade da água destinada ao abastecimento público (ROSARIO, 2007).

Existem duas tecnologias que podem ser adotadas no processo de filtração, a de filtração lenta e a de filtração rápida. Quando é adotada a de filtração lenta, não é usado, previamente, o processo de coagulação química. Neste caso, o processo é biológico, onde são adotadas formas mais rudimentares e naturais para a purificação da água. Essa técnica consiste na passagem lenta da água por um meio filtrante poroso, como a areia. Ao passar pela areia, o material suspenso fica retido. Na filtração lenta, os filtros podem ser limpos com uma menor frequência, sendo uma operação simplificada. Tal procedimento foi perdendo espaço, à medida que o processo de coagulação foi sendo adotado pelas ETA (DE PÁDUA, 2010; GOMES, 2012; SOUZA et al., 2018). Já a filtração rápida é adotada após a utilização de um agente coagulante, que promove um aumento da capacidade de filtração, a redução da cor, além de poder ser utilizada pela ETA cuja água captada apresentam maior turbidez ou sólidos dissolvidos. Esta filtração exige um custo maior de implantação, operação e manutenção. A filtração rápida requer uma maior frequência de limpeza, com periodicidade entre 20 a 50 horas, dependendo das características da água bruta (DE PÁDUA, 2010; SOUZA et al., 2018).

2.3.6 Desinfecção

O processo de pós-cloração tem a finalidade de aumentar o cloro residual livre da água de abastecimento. É um processo considerado extremamente importante para a desinfecção da água, antes da mesma ser destinada ao abastecimento público (DIAS; LIBRANTZ; DOS SANTOS, 2020). A utilização de técnicas que usam agentes físicos ou químicos para eliminar microrganismos patogênicos da água tratada, garantem aos consumidores uma água de boa qualidade (LIBÂNIO, 2010; GILCA et al., 2020).

A inativação dos organismos patogênicos se dá por ação de desinfetantes. Esses químicos promovem a destruição dos microrganismos ou causam interferências no metabolismo deles, como por exemplo, alteração da síntese proteica ou danos no material

genético, que impedem a proliferação desses patógenos (ROSARIO, 2007; DE PÁDUA, 2010; LIBÂNIO, 2010).

Os agentes desinfetantes podem ser divididos em dois grupos, os químicos e os físicos. Os desinfetantes químicos são compostos ou elementos com potencial oxidantes. Dentre eles, destacam-se os a base de cloro, peróxido de hidrogênio, bromo, iodo e ozônio. Já dentre os agentes físicos usados como desinfetantes temos o calor, radiação UV, radiação gama ou radiação solar (ROSARIO, 2007; LIBÂNIO, 2010).

De acordo com Collivignarelli et al. (2018), os agentes químicos ou físicos são os mais usados, convencionalmente, na desinfecção da água, mas existem técnicas avançadas que apresentam também grande eficiência nesta ação. Nas técnicas avançadas são utilizadas combinações de métodos, como o ozônio e peróxido de hidrogênio, ozônio e radiação UV, radiação UV e peróxido de hidrogênio, radiação UV com dióxido de titânio, bem como a utilização de membranas.

Os desinfetantes mais utilizados no processo de desinfecção são os a base de cloro, devido ao baixo custo, serem facilmente manipulados e apresentarem uma alta eficiência na inativação de diferentes microrganismos patogênicos. O cloro inativa as enzimas relacionadas ao processo de nutrição dos microrganismos, inviabilizando o desenvolvimento dos mesmos (COLLIVIGNARELLI et al., 2018). Além disso, o cloro tem baixo efeito residual, durante a distribuição da água pelo sistema público de abastecimento (SADIQ; RODRIGUEZ, 2004; ROSARIO, 2007; CHAUDHARY, 2020; GILCA et al., 2020; SRIVASTAV; PATEL). No entanto, o cloro necessita de um maior tempo de contato com os microrganismos, para ter uma ação mais efetiva de desinfecção.

Foram descobertos na década de 1970, alguns subprodutos derivados do processo de desinfecção por cloro (HOW et al., 2017). Hoje, já são conhecidos cerca de 600 subprodutos de desinfecção, onde existe informações de alguns deles terem comprovada toxicidade. Assim, apesar da eficiente do cloro em neutralizar os organismos patogênicos, a cloração pode gerar subprodutos não intencionais, devido às suas propriedades de reação com compostos orgânicos ou inorgânicos presentes na água (HOW et al., 2017; COLLIVIGNARELLI et al., 2018). De acordo com Abda et al. (2015), alguns destes subprodutos formados podem ter caráter mutagênico e/ou carcinogênico, podendo representar risco a saúde humana, em longo prazo. Dentre os subprodutos de maior

preocupação para a saúde humana, destacam-se os trihalometanos e os ácidos haloacéticos, os quais são, comprovadamente, citotóxicos e genotóxicos (YU et al., 2021).

O cloro presente na água pode estar em sua forma livre; combinada com compostos inorgânicos, formando cloroaminas inorgânicas (monocloroaminas, dicloroaminas e tricloroaminas); ou com compostos orgânicos, formando N-cloroaminas, ácidos N-cloroaminos, N-cloroaldiminas e N-cloramidas (HOW et al., 2017). De acordo com Warton et al. (2006) as substâncias inorgânicas, principalmente reduzidas, como o ferro, manganês, sulfeto, brometo e amônia, correspondem as espécies que mais reagem com o cloro. Essas reações são consideradas mais rápidas, quando comparada com as reações com a matéria orgânica. Devido a isso, a identificação e mensuração da concentração de cloro na água é dificultada.

2.3.7 Fluoretação

O flúor é um composto extremamente reativo, pela sua afinidade eletrônica e eletronegatividade. Por ser um elemento instável, ele é encontrado na forma de gás F_2, não sendo encontrado em sua forma isolada na natureza e sim complexado ou em sua forma ionizada (fluoreto). O flúor tem grande afinidade para reagir com o hidrogênio e elementos metálicos (JOHNSTON; STROBEL, 2020).

A adição de cloro na água de abastecimento público (fluoretação) deu início, no Brasil, no ano de 1953 (RAMIRES; BUZALAF, 2007), com o intuito de prevenir cáries dentárias, em crianças menores de 8 anos, e ajudar a calcificação do esmalte dos dentes. A utilização desse método é recomendada por organizações como OMS (Organização Mundial da Saúde) e OPAS (Organização Pan-Americana de Saúde) (PIZZO et al., 2007; JAGTAP et al., 2012; MOIMAZ et al., 2020). Contudo, se a água de abastecimento público apresentar excesso de flúor, ela pode desencadear efeitos adversos na população, como fluorose dentária (dentes de coloração marrom amarelado). Além disso, o excesso de flúor pode causar neurotoxicidade, problemas de irritações no estomago, dor abdominal, diarreia, deformações nos ossos, alterações da tireoide e aumento de cálculos renais (FREITAS et al., 2021; KASHYAP; SANKANNAVAR; MADHU, 2021).

As etapas adotadas durante o tratamento da água bruta realizado pelas estações de tratamento de água (ETA) estão resumidas na Tabela 1.

Tabela 1 – Etapas do tratamento da água bruta realizado pela ETA

Etapa	Agente	Função
Pré-cloração	Gás cloro	Esse processo contribui para a desinfecção da água, controla o crescimento de algas, aumenta a coagulação, melhorando a eficiência da floculação e também pode promover a oxidação de substâncias (orgânicas ou inorgânicas) presentes na água.
Coagulação	Coagulante metálico (a base de alumínio ou ferro) ou polímeros	O coagulante ao ser adicionado a água promove a desestabilização das partículas coloidais presentes na água bruta. Essa desestabilização é importante para que haja uma diminuição do caráter repelente dos coloides, fazendo com que eles possam se agregar.
Floculação	Agitação mecânica	A água segue para tanques (floculadores) com agitação mecânica lenta, fazendo com que as partículas coloidais presentes na água se choquem e comecem a se agregar, formando flocos de diferentes tamanhos
Decantação	Ação da gravidade	No processo de decantação o a água que estava nos floculadores segue para tanques (decantadores) onde pela ação da gravidade as impurezas vão sedimentar no fundo dos decantadores.
Filtração	Filtração lenta (meio filtrante poroso) ou filtração rápida (diferentes meios filtrantes)	A filtração consiste na passagem da água por um agente filtrante para a remoção das impurezas restantes e microrganismos que possam estar presentes na água. É nessa etapa em que são estabelecidos os padrões de potabilidade da água.
Desinfecção	Desinfetante (o mais utilizado é a base de cloro)	A água eu sai da filtração e é submetida ao processo de desinfecção para a remoção de microrganismos patogênicos para assim fornecer á população uma água de qualidade.
Fluoretação	Flúor	Antes da água ser distribuída para a população é recomendado que haja o processo de fluoretação, adição de flúor a água como forma de prevenção a cárie dentária.

Fonte: autoria própria.

2.4 Resíduos Produzidos pelas ETA

De acordo com Achon (2008), a maioria das ETA não tratam os resíduos gerados nos processos de lavagem dos decantadores e dos filtros, sendo os mesmos lançados diretamente nos corpos hídricos receptores, o que, de acordo com o mesmo autor, se caracteriza em um crime ambiental.

O volume de lodo gerado em decantadores é altamente depende da qualidade da água captada, dos reagentes utilizados no processo de coagulação, bem como da técnica adotada pela ETA para a realização dessa limpeza. Por esta razão, os resíduos do decantador podem apresentar altas concentrações de sólidos (superior a 2,5%) que, dependendo da concentração gerada, pode levar a um comprometimento considerável, principalmente, da camada bentônica do corpo hídrico receptor (ACHON, 2008).

A frequência da limpeza do decantador pode ser realizada mecanicamente ou manualmente. O período de limpeza depende da quantidade de sólidos suspensos na água, mas, de qualquer forma, a remoção do lodo do decantador deve ocorrer com frequência, para que não haja solubilização de substâncias ou metais que possam prejudicar a saúde humana (DE PÁDUA, 2010).

Os resíduos da lavagem do decantador não são os únicos produzido em uma ETA, pois a água de lavagem dos filtros também produz resíduos. Os filtros precisam ser lavados periodicamente, principalmente os de filtração rápida. A remoção dos resíduos dos filtros normalmente é feita por jatos d’água de alta velocidade. Os resíduos da lavagem podem retornar ao processo de tratamento, porém, na maioria das vezes, eles são descartados em corpos hídricos (ROSARIO, 2007). Esse lançamento indevido dos efluentes das ETA nos ambientes aquáticos pode levar a um aumento da concentração de metais (alumínio e ferro) associados ao tipo de coagulante utilizado no tratamento da água. Esse aporte extra de metais pode induzir alterações na disponibilidade de nutrientes para a biota aquática; aumentar a anaerobiose do sistema e a presença de sólidos em suspensão, fatores esses que acabam influenciando na turbidez no recurso hídrico receptor (SOBRINHO et al., 2019).

A geração dos efluentes e resíduos das ETA pode ser controlada pelo uso de polímeros de origem orgânica ou biopolímeros, usados durante o processo de coagulação. Tais compostos, extraídos de fontes naturais e do meio biológico (animais, vegetais ou

microrganismos), conferem vantagens por não serem tóxicos para humanos e serem biodegradados. Os biopolímeros ainda não precisam ser utilizados em dosagens elevadas, o que reduz a produção de lodo e os impactos no pH ou alcalinidade (RENAULT et al., 2009; SARITHA; SRINIVAS; VUPPALA, 2017). O lodo do decantador precisa passar por um processo de redução de volume, que é feito pelo método de desidratação (SOBRINHO et al., 2019). A desidratação do lodo do decantador pode ser feita pela técnica de leito de secagem, que é um dos processos utilizado a muito tempo como forma de drenagem da água (ANDREOLI, 2001; ACHON; BARROSO; CODERIRO, 2008).

O lodo do decantador pode ter como destino final aterros sanitários ou aterros específicos, ser gerenciado juntamente com o lodo de estações de tratamento de esgoto (ETE), ser utilizado como biossólido ou para a recuperação de áreas degradadas, ou ser aproveitamento por indústrias (REIS et al., 2007; SOBRINHO et al., 2019). O resíduo do lodo do decantador tem, ainda potencial para ser utilizado na produção de materiais cerâmicos (tijolos e telhas) (MONTEIRO et al., 2008; ARAÚJO et al., 2015), bem como em mistura com cimento ou artefatos de concreto (ARAÚJO et al., 2015). Contudo, pelo lodo do decantador poder apresentar uma concentração de sólidos acima de 2,5%, seu descarte em ambientes aquáticos pode levar a um comprometimento considerável do estrato bentônico do corpo receptor (ACHON, 2008).

Cunha (2004) considera que a determinação da capacidade de geração de lodo no decantador de uma ETA é um dos fatores mais importante para a definição da melhor forma de operação da ETA.

2.5 Estação de Tratamento de Água Estudada

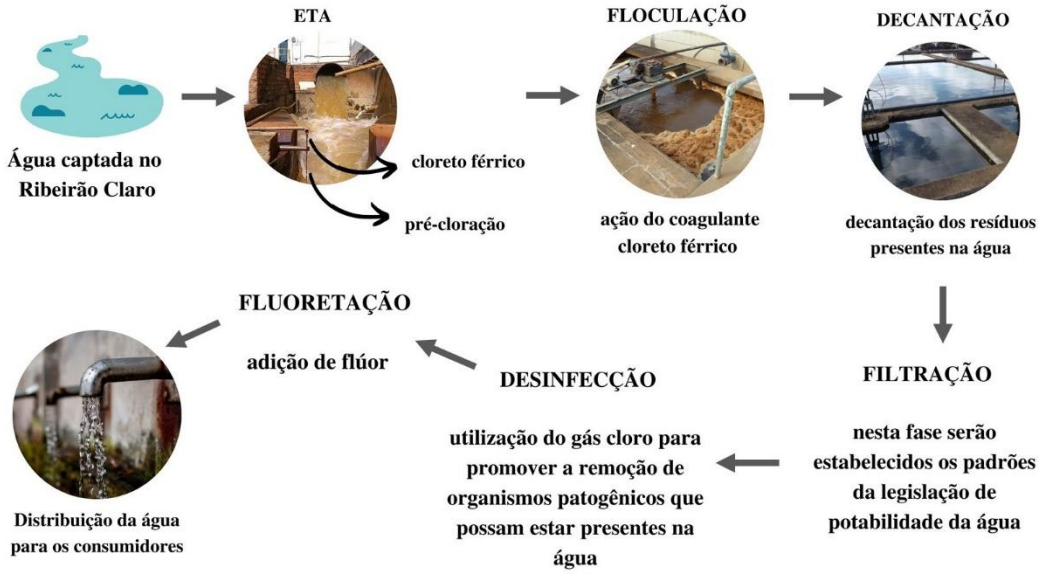
A ETA localizada na cidade de Rio Claro, capta suas águas para abastecimento público no Ribeirão Claro. O Ribeirão Claro tem como afluente o Córrego Santo Antônio, que é canalizado, e estes corpos hídricos fazem parte da 5 UGRHI (Unidade Hidrográfica de Gerenciamento de Recursos Hídricos), composta pelos rios Piracicaba, Capivari e Jundiaí. A ETA estudada tem como processo de tratamento adotado o convencional, portanto segue as etapas de: floculação, decantação, filtração, desinfecção e fluoretação (DAAE, 2022; PORTAL SIGRH, [s.d.]).

A ETA, atualmente, apresenta sérios problemas estruturais. Como essa ETA está localizada na região central da cidade, onde não há mais espaço para sua ampliação, está sendo viabilizado um novo local para a construção de uma nova ETA, que terá como sistema de tratamento o de lodo integrado.

Pelo relatório de fiscalização e não conformidades, elaborado pela Agência Reguladora dos Serviços de Saneamento das Bacias dos Rios Piracicaba, Capivari e Jundiaí (ARESPCJ, 2018), a ETA de Rio Claro não realiza nenhum procedimento de tratamento dos resíduos, descumprindo o Decreto Estadual número 8.468/1976. Além disso, de acordo com o relatório de continuação diagnóstico e não conformidade, também elaborado pela ARESPCJ (2015), a ETA aplica em seu processo de tratamento da água: a correção do pH por cal hidratada; coagulação por cloreto férrico; pré-cloração da água com gás cloro; floculação hidráulica; decantação convencional; filtração rápida e com frequência de limpeza de 24 horas; desinfecção com o gás cloro e a aplicação automática de flúor. Neste relatório foi apontado a inexistência de um processo de desidratação do lodo ou uma destinação correta do mesmo.

A Figura 1 apresenta um esquema ilustrativo do sistema de tratamento de água adotado na ETA de Rio Claro. No procedimento adotado, (convencional), a água captada no Ribeirão Claro recebe o agente coagulante cloreto férrico; a pré-cloração e floculação. Posteriormente, a água segue para o decantador e é submetida a um processo de filtragem, antes de ser distribuída para a população, passa ainda por uma desinfecção e fluoretação.

Figura 1 – Esquema ilustrativo do tratamento de água adotado pela Estação de Tratamento de Água da cidade de Rio Claro



Fonte: autoria própria.

2.6 Biomonitoramento para avaliação ambiental

O biomonitoramento ambiental consiste na observação dos impactos sofridos pelo ambiente, em decorrência de fatores externos que acontecem em um determinado período de tempo. O biomonitoramento pode ser feito por bioindicadores (organismos, parte de um organismo, ou ainda por comunidades biológicas) que, por apresentarem alta sensibilidade a xenobiontes, fornecem informações importantes sobre a qualidade do ambiente. Para a avaliação dos impactos ambientais, são desenvolvidos ensaios com os bioindicadores (bioensaios) mais indicados para cada tipo estudo. De maneira geral, os bioensaios de monitoramento ambiental são de curta duração, pela necessidade da urgência de busca de solução, e cuja análise deve ser repetida periodicamente (VAN STRAALEN, 1998; LI; ZHENG; LIU, 2010). Para uma avaliação ambiental, podem ser utilizados marcadores biológicos, como por exemplo, componentes celulares, estruturais e/ou bioquímicos, que definem as alterações celulares e moleculares relacionados com a exposição ou efeitos tóxicos de produtos químicos (DÖRR et al., 2014), tanto em células normais quanto em células associadas com a transformação maligna. A importância dos biomarcadores está relacionada com a possibilidade de obtenção de informações em

diferentes níveis de organização animal, antes que sejam observadas alterações em nível populacional, de comunidade ou no ecossistema (CZENAVE; AMÉ; MENONE, 2021).

O Artigo 18 da Resolução 430 do CONAMA (BRASIL, 2011) recomenda que sejam utilizados, para biomonitoramento ambiental, bioensaios com organismos de, pelo menos, dois níveis tróficos diferentes. Essa exigência tem a finalidade de estabelecer padrões ecotoxicológicos seguros, para o lançamento de qualquer efluente em um corpo receptor. De Castro (2013) também recomenda que a avaliação do potencial tóxico de uma substância ou de uma amostra ambiental seja feita com bioensaios realizados com espécies de diferentes níveis tróficos.

2.6.1 Bioindicadores Vegetais

Os bioindicadores vegetais estão sendo cada vez mais utilizados em bioensaios de avaliação da qualidade ambiental, devido às suas características de sensibilidade a diversos contaminantes, por avaliar diferentes *endpoints* (citogenotóxicos e mutagênicos), pela possibilidade de utilização de diferentes órgãos ou tecidos (folhas, raízes ou pólen) e por poderem acumular poluentes. As plantas superiores mais utilizadas para a avaliação ambiental são: *Allium cepa*, *Vicia faba*, *Zea mays*, *Tradescantia*, *Nicotiana tabacum*, *Crepis capillaris, Hordeum vulgare* e *Lactuca sativa*. Além disso, os bioensaios vegetais apresentam baixo custo, alta disponibilidade de aquisição, metodologia simples e de fácil reprodução, necessidade de pequeno volume de amostra, sementes viáveis por longos períodos, além de fácil germinação (GADZAŁA-KOPCIUCH et al., 2004; LEME; MARIN-MORALES, 2009; PRIAC; BADOT; CRINI, 2017). A raiz é um dos primeiros órgãos afetados pelos compostos químicos, uma vez que essa estrutura tem a função de absorção e a possibilidade de acumulação dos mesmos (PARK et al., 2016). Dessa forma, a raiz se mostra um importante marcador a ser estudado, podendo ser utilizado para a avaliação da fitotoxicidade, citogenotoxicidade e do potencial mutagênico. Dentro os organismos vegetais, as espécies *Lactuca sativa* e *Allium cepa* se destacam como excelentes indicadores da qualidade ambiental.

2.6.1.1 *Lactuca sativa*

A espécie *L. sativa* é um organismo teste muito utilizado em bioensaio de fitotoxicidade, sendo recomendado por agências internacionais como EPA (2012) e OECD (2006), para avaliação ecotoxicológica de compostos químicos isolados até amostras ambientais complexas (SOBRERO; RONCO, 2004). Os testes com *L. sativa* são rápidos, simples, confiáveis, baratos e não necessitam de equipamentos caros para a sua realização. Os testes de germinação e de alongamento da radícula/hipocótilo são parâmetros muito utilizados para a determinação do potencial fitotóxico de contaminantes ambientais (LYU et al., 2018), como metais, resíduo sólido proveniente do processo industriais, de substâncias de uso urbano e agrícola e de químicos diversos que apresentem suspeita de toxicidade (FJÄLLBORG et al., 2006; TIGRE et al., 2012; SILVEIRA et al., 2017).

Esse organismo também é utilizado para avaliar o potencial tóxico de amostras ambientais complexas, como os efluentes industriais e urbanos, como os das estações tratamento de água e esgoto. A aplicação de bioensaios com esse organismo teste vem sendo feito por muitos pesquisadores, como Young et al. (2012), que avaliaram a germinação e alongamento da raiz de alface, após processo de tratamento usado para redução da toxicidade de efluente de biorreatores; Batista et al. (2021), que estudaram, pelo teste de germinação, os impactos promovidos por efluentes de uma ETA localizada em Aracaju (SE), e Mendes (2019) que avaliou a fitotoxicidade das águas de dois corpos hídricos localizados em Campo Mourão (PR), os quais são impactados por atividades antrópicas. Portanto, o bioindicador *L. sativa* apresenta eficiência comprovada para avaliar a fitotoxicidade de compostos ou substâncias químicas e de amostras ambientais (água, solo ou sedimento), mas também pode ser utilizado em avaliação de possíveis impactos generalizados em uma determinada área geográfica, mostrando ser importante bioindicador a ser usado em monitoramento ambiental.

2.6.1.2 *Allium cepa*

O *A. cepa* é um organismo vegetal muito utilizado nas avaliações de possíveis alterações no ciclo celular e/ou cromossômica, após exposição a agentes químicos ou amostras ambientais, principalmente por apresentam cromossomos grandes e em número

reduzido (2n=16) (FISKESJÖ, 1985; LEME; MARIN-MORALES, 2009). Os testes com *A. cepa* são recomendados para serem utilizados na detecção de possíveis mutágenos, pois os efeitos observados neste organismo se assemelham a efeitos desencadeados em outros organismos, inclusive em mamíferos (LAUGHINGHOUSE et al., 2012). *A. cepa* tem sido muito utilizado em avaliações da poluição ambiental e em monitoramentos da qualidade ambiental. O bioensaios realizados com biomarcadores de citotoxicidade, genotoxicidade e de potencial mutagênico desse bioindicador têm se mostrado efetivos e confiáveis para a serem usados em avaliação ambiental (LEME; MARIN-MORALES, 2009).

Alguns estudos realizados com esse bioindicador confirmam a eficiência do *A. cepa* para ser usado em monitoramento ambiental. Matsumoto et al. (2006) avaliaram os impactos causados pelo lançamento do efluente de curtume no Córrego dos Bagres da cidade de Franca-SP. Caraitá e Marin-Morales (2008) realizaram estudos para a avaliação dos impactos do efluente de uma fábrica de tingimento têxtil em Cajamar (SP). Manzano (2010) também fez uma avaliação da qualidade das águas do Ribeirão Tatu, localizado na cidade de Limeira-SP. Bianchi, Espindola e Marin-Morales (2011) avaliaram as condições das águas do Rio Monjolinho, localizado em São Carlos-SP, a montante e jusante do recebimento de efluentes domésticos e industriais. Silva et al. (2013) se propôs avaliar a eficiência do tratamento a água de abastecimento, bem como a segurança da água disponibilizada para o consumo humano, depois da utilização de gás cloro e hipoclorito em três estações de tratamento de água na cidade de Piracicaba. Souza (2014) também avaliou a qualidade da água e sedimento em pontos de coleta no Rio Corumbataí, antes do ponto de captação da ETA Capim fino na cidade de Piracicaba-SP. Faria et al. (2017) avaliou a qualidade das águas do Rio Jaru, localizado no município de Jaru-RO. Pereira (2017) propôs uma avaliação de amostras de água e sedimento do Rio São Francisco, próximo ao polo Petrolina/Juazeiro, a fim de detectar possíveis contaminantes que possam estar ali presentes. Mendes (2019) avaliou os possíveis impactos que dois rios em Campo Mourão estavam sofrendo e Silva (2019) realizou um monitoramento da qualidade das águas do Rio Ipojuca, em diferentes pontos do seu percurso.

Frente aos resultados consistentes obtidos com os testes de *A. cepa* em monitoramento da qualidade de recursos hídricos impactados por diversas atividades antrópicas, esse organismo tem sido indicado para ser usado em avaliação dos impactos de descarte dos efluentes gerados em Estações de Tratamento de Água. Assim, no

presente estudo, esse bioindicador será utilizado para avaliar se o efluente da ETA de Rio Claro, descartado *in natura* nos corpos hídricos receptores, apresenta potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico para as águas dos rios receptores. Também será avaliado se o tratamento realizado pela ETA está conferindo segurança para a água destinada ao abastecimento público da cidade de Rio Claro.

2.6.2 Cultura de Células HepG2/C3A

Os ensaios com cultura de células são utilizados em diferentes estudos pelo fato de seus resultados apresentarem uma resposta rápida e não ser necessária a utilização de animais como nos testes *in vivo* (ŠTAMPAR et al., 2021). A linhagem celular HepG2 é derivada de células de hepatoma humano e, por isso, é uma linhagem com potencial metabolizador, pois apresenta enzimas capazes de metabolizar drogas ou xenobióticos. Dessa forma, essa linhagem é utilizada em diversos estudos de toxicidade (VALENTIN-SEVERIN et al., 2003; GUO et al., 2011; ŠTAMPAR et al., 2021).

A linhagem celular C3A corresponde a um clone da HepG2, portanto, também metabolizadora (COLTMAN et al., 2021). Assim, por se tratar de uma célula metabolizadora humana, a HepG2/C3A, quando usada em avaliações da qualidade de águas impactadas por contaminantes de origem antrópica, seus resultados podem ser extrapolados, com cautela, para possíveis efeitos desses agentes tóxicos para humanos.

Corroqué (2019) utilizou linhagem a celular metabolizadora humana HepG2/C3A para avaliar os impactos da extração de ouro presente em arsenopirita sobre rios do município de Paracatu (MG), comprovando a adequabilidade de uso dessas células em monitoramento ambiental; Pamplona (2017) realizou estudos dos impactos de exo e endotoxicinas liberadas por cianobactérias sobre ambiente com floração de cianotoximas; Souza et al. (2020), também realizaram estudos para avaliar possíveis impactos promovidos por plásticos biodegradáveis sobre culturas de morangos.

2.6.2.1 MTT

Apesar de existirem diversos testes colorimétricos para a determinação da citotoxicidade de agentes químicos, o teste do MTT [(3(4-5-dimetil-2-tiazol)-2-5-difenilbrometo de tetrazólio)] é um dos mais utilizados, já que pode detectar os efeitos de

compostos químicos sobre a viabilidade celular. O teste colorimétrico do MTT quantifica danos induzido por um agente sobre o metabolismo celular, pela avaliação da atividade de desidrogenases mitocondriais. Um agente é considerado citotóxico, quando induz danos na estrutura ou na função celular, promovendo alterações fisiológicas, que podem desencadear ou não o processo de morte celular (LEME et al., 2011).

O teste consiste na redução do sal do MTT (de coloração branca), pela ação de enzimas mitocondriais oxidorredutases, onde o grupo fenil presente no anel tiazolil é substituído, formando, no final da reação, cristais de formazan, que por solubilização em DMSO (dimetilsulfoxi) adquire a coloração roxa ou púrpura. A partir dessa coloração é possível estimar o número de células viáveis (vivas) pela intensidade da coloração (MOSMANN, 1983; BERRIDGE; HERST; TAN, 2005; AGUILHEIRA-PORTILLO et al., 2019)

O ensaio do MTT já foi utilizado para a avaliação de amostras ambientais, como forma de monitorar ambientes impactados com compostos citotóxicos. Pode-se citar o estudo da investigação do potencial citotóxico de efluentes (hospitalares e industriais), amostra de água superficial dulcícolas e amostras de água potável (ŽEGURA et al., 2009); avaliação do potencial citotóxico de amostras do Rio Rolante, afluente do Rio dos Sinos na cidade de Rolante (TRINTINAGLIA et al., 2015); avaliação do potencial citotóxico de água residuais de tingimento têxtil (AKHTAR et al., 2016) e monitoramento do potencial citotóxico de amostras de água da Bacia do Rio dos Sinos, que sofre com a ação de resíduos urbanos, agrícolas e industriais (BIANCHI et al., 2016).

2.6.2.2 Ensaio do Cometa

O Ensaio do Cometa ou Single Cell Gel Electrophoresis (Eletroforese em Gel de Célula Única) consiste em uma metodologia de análise do potencial genotóxico de compostos químicos, que é capaz de detectar até os mais baixos níveis de danos induzidos ao material genético. Esse teste detecta lesões no DNA que são passíveis de reparo, portanto não resultando, necessariamente, em mutações. Este ensaio permite a detecção de quebras de fita simples e dupla, sítios álcali-lábeis, ligações cruzadas de DNA-DNA, de proteína e DNA, bem como quebras de fita simples que associadas aos sítios de reparo (CONTIJO; TICE, 2003; SANTOS et al., 2021). De acordo com Collins

(2004), o ensaio do cometa se tornou um método padrão para avalição de danos ao DNA, em testes de genotoxicidade, biomonitoramento e epidemiologia molecular e estudos ecotoxicológicos. Tal consolidação se deu devido a sua sensibilidade, simplicidade, versatilidade, rapidez de execução e baixo custo.

Este ensaio é fundamentado pelo princípio de que as alças de DNA estão enoveladas e presas em uma matriz nuclear. A ação da solução de lise leva a alterações nas enzimas envolvidas no enovelamento do DNA, fazendo com que haja um relaxamento das alças do DNA. Dessa forma, caso haja quebras no DNA durante a eletroforese, os fragmentos menores são atraídos. Mais rapidamente, para o polo positivo (ânodo). Esse deslocamento confere aos nucleóides o formato de cauda de cometa (característica esta que dá nome ao ensaio), quando observado em microscopia de fluorescência. Dessa forma, a frequência das quebras ocorridas no DNA é refletida na porcentagem de DNA presente na cauda do cometa (SANTOS et al., 2021).

O Ensaio do Cometa pode apresentar algumas versões, como pH alcalino e neutro. A versão alcalina do cometa detecta quebras de fita simples e duplas, em que o agente testado interagiu diretamente com o DNA, sítios álcali-lábeis ou quebras transitórias de fita de DNA (OECD, 2016a). Já a versão neutra, detecta as quebras de fita dupla, sem que haja a interferência das quebras de fita simples (COLLINS, 2004).

De acordo com a OECD (OECD, 2016a), as quebras do DNA são medidas pelos *endpoints* de intensidade da cauda (*tail intensity* ou % tail DNA), momento da cauda (*tail moment*) e comprimento da cauda (*tail lenght*). A intensidade da cauda se dá pela porcentagem de fluorescência na cauda do cometa, sendo mais indicado para a quantificação da frequência de quebras no DNA; o comprimento da cauda é dado pela distância entre a “cabeça do nucleóide” e a extremidade distal da cauda; e o momento da cauda é dado pelo produto do comprimento da cauda e a fração do DNA na cauda, portanto o produto obtido entre a intensidade e comprimento da cauda (AFANASIEVA; SIVOLOB, 2018; SANTOS et al., 2021).

O Ensaio do Cometa vem sendo muito utilizado para avaliar o potencial genotóxico de diversos compostos e para a realização de monitoramento da toxicidade ambiental. Manzano et al. (2015) avaliaram pela técnica do cometa o potencial de genotoxicidade para células HTC de amostras de água coletadas no Ribeirão Tatu (Limeira-SP); Deutschmann et al. (2016) utilizaram eritrócitos de *Alburnus alburnos* (peixe), para avaliar

o potencial genotóxico de amostras de água coletadas no Rio Danúbio; Hemachandra e Pathiratne, (2016) avaliaram o potencial genotóxico de efluentes têxtil, pós tratamento e antes dos mesmos serem lançamento no Rio Kelani (Siri Lanka), aplicando a técnica do ensaio do cometa em eritrócitos de *Oreochromis niloticus* (tilápia); Simonyan et al. (2016) avaliaram a genotoxicidade de contaminantes das águas da bacia do Lago Sevan (Armênia), pelo ensaio do cometa, em carpa prussiana (*Carassius auratus gibelio*); Hariri et al. (2018) avaliação os impactos de poluentes no Rio Karaj (província de Alborz/Irã), aplicando o ensaio do cometa em sangue, fígado, brânquias e rins, de *Salmo trutta* coletados *in situ*; Pellegri et al. (2020) avaliação do potencial genotóxico de amostras de água do Córrego Parma, Baganza e Cinghio, localizados na província de Parma (norte da Itália), utilizando a técnica do ensaio do cometa em *Daphnia magna*.

2.6.2.3 Ensaio do Micronúcleo com Bloqueio de Citocinese

O Ensaio do Micronúcleo com Bloqueio de Citocinese (MN) é muito utilizado para a detecção de danos genéticos promovidos por diferentes substâncias ou amostras. Este ensaio pode ser realizado tanto em testes *in vivo* como *in vitro*, e é um biomarcador reconhecido e indicado para ser usado em análise de genotoxicidade (MANTOVANI et al., 2021). Os micronúcleos (MN) são formados em decorrência de fragmentos de cromossomos, ou de cromossomos inteiros que foram perdidos no processo de divisão celular (FENECH; CROTT, 2002).

Para a avaliação do potencial genotóxico pelo ensaio do micronúcleo com bloqueio da citocinese é necessária a utilização de Citocalasina B, que é um agente que bloqueia a citocinese, mantendo as células, ao final da divisão, com dois núcleos (binucleada). A Citocalasina B promove a inibição da polimerização da actina que formará o anel contrátil de microfilamentos, responsáveis pela separação do citoplasma (FENECH, 2000).

Neste ensaio as células são tratadas com uma solução hipotônica que promove o aumento do seu volume citoplasmático e facilita a observação dos MN, bem como de outras alterações como ponte nucleoplasmáticas e brotos nucleares. Além disso, pode ser avaliado nesse ensaio, o Índice de Proliferação Celular do Bloqueio de Citocinese (CBPI). Esse Índice avalia a proporção das células mononucleadas, células binucleadas e

multinucleadas (FENECH et al., 2003), e é utilizado para estimar a atividade citotóxica de um agente (OECD, 2016b).

O ensaio do MN pode ser utilizado para a avaliação do potencial genotóxico de diversos compostos e para o monitoramento ambiental. Esse ensaio vem sendo realizado por diversos pesquisadores de áreas distintas e com diferentes bioindicadores. Ribeiro et al. (2014) utilizaram a técnica do ensaio do MN em *Astyanax paranae*, para avaliar o potencial genotóxico das águas do Rio São Francisco (PR); Morais et al. (2016) realizaram seus estudos de genotoxicidade, pelo teste do MN, com o organismo teste *Geophagus brasiliensis,* com o intuito de verificar o impacto dos poluentes presentes na água de um córrego que atravessa a cidade de Monte Carmelo (MG); o potencial genotóxico de águas superficiais de rios da cidade de Shijiazhuang (China) foi avaliado pelo ensaio do MN com a linhagem celular CHO-K1, por Han et al. (2016); Hara e Marin-Morales (2017) avaliaram os possíveis impactos promovidos pelos efluentes da refinaria do Planalto (REPLAN), sobre o Rio Atibaia, na altura do município de Paulínia (SP), por meio do ensaio do MN desenvolvido com a linhagem celular CHO-K1.

Os ensaios descritos acima constituem uma bateria de testes interessantes e indicados para serem utilizados em monitoramento ambiental. Por essa razão, o presente estudo realizou bioensaios com três diferentes bioindicadores, para avaliar, com mais segurança, os impactos que os efluentes de uma ETA da cidade de Rio Claro (lançados *in natura nos corpos hídricos*), promovem nos recursos hídricos receptores (Córrego Santo Antônio e Ribeirão Claro). Para essa análise foram realizados ensaios de fitotoxicidade com *L. sativa* (teste de germinação)*;* de citogenotoxicidade *com A. cepa* (teste de índice mitótico, morte celular, de aberrações cromossômicas e do MN); e cito e genotoxicidade com a linhagem celular HepG2/C3A (teste do MTT, ensaio do cometa e ensaio do MN). Também foi avaliado no estudo a qualidade da água distribuída à população, pelos mesmos ensaios realizados com as amostras das águas coletadas nos rios receptores do efluente. As avaliações realizadas trazem importantes informações à população da cidade Rio Claro, sobre os possíveis impactos ambientais causados pelo descarte indevido do efluente da ETA e sobre a eficiência do tratamento convencional realizado pela ETA e, consequentemente, a qualidade da água de abastecimento público da cidade.

2 OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo geral avaliar os impactos do descarte de efluentes de uma ETA do município de Rio Claro-SP, sobre o Córrego Santo Antônio que é afluente do Ribeirão Claro, e avaliar a eficiência do processo de tratamento de água adotado por esta ETA. Dessa forma, os objetivos específicos do presente estudo foram:

- Monitorar a qualidade da água do Córrego Santo Antônio (afluente do Ribeirão Claro), no ponto em que não há a influência do efluente da ETA e em um ponto onde há a influência do efluente, por meio de ensaios físico-químicos, microbiológicos, ensaios de fitotoxicidade, citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade, realizados em *Lactuca sativa*, *Allium cepa* e com a linhagem celular HepG2/C3A;

- Monitorar as águas do Ribeirão Claro: nos pontos referentes a captação da água para abastecimento público; a montante do lançamento do efluente da ETA e a jusante do lançamento do efluente da ETA; após o ponto de mistura completa, por meio de ensaios físico-químicos microbiológicos, ensaios de fitotoxicidade, citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade, realizados em *Lactuca sativa*, *Allium cepa* e com a linhagem celular HepG2/C3A;

- Monitorar a eficiência do tratamento e a qualidade da água de abastecimento público fornecido pela ETA de Rio Claro, por meio de ensaio físico-químicos microbiológicos, ensaios de fitotoxicidade, citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade, realizados em *Lactuca sativa*, *Allium cepa* e com a linhagem celular HepG2/C3A.

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 Estação de Tratamento de Água Estudada

A ETA utiliza o processo convencional de tratamento (floculação, decantação, filtração, desinfecção e fluoretação). A captação de água é feita em no Ribeirão Claro), recurso hídrico enquadrado como rio de Classe II, conforme Resolução CONAMA 357, órgão ambiental consultivo e deliberativo brasileiro.

A ETA tem como características de tratamento a correção do pH com cal hidratada; o cloreto férrico como agente coagulante; a pré-cloração e desinfecção feita com o gás cloro; floculação hidráulica, decantação convencional; filtração do tipo rápida (filtros de cascalho, areia grossa e areia fina); e fluoretação automática (Relatório ARESPCJ, 2015). A ETA não adota nenhum processo de tratamento ou desidratação do lodo gerado, descartando todo efluente da estação de tratamento, *in natura*, no Córrego Santo Antônio, um afluente do Ribeirão Claro.

3.2 Pontos de Coleta

Para avaliação da qualidade das águas dos rios relacionados com a captação e descarte de efluentes da ETA, bem como da eficiência do tratamento realizado pela ETA e, consequentemente da qualidade da água de abastecimento, foram estabelecidos 6 diferentes pontos para a coleta das amostras de água (Figuras 2, 3 e 4), como segue:

1. CAP – Ponto de captação da ETA;

2. SAS – Córrego Santo Antônio, momento em que as águas estão sem a influência do efluente da ETA;

3. SAE – Córrego Santo Antônio, cujas águas já tem a influência do efluente da ETA (este ponto está localizado 100 m antes da confluência do córrego com o Ribeirão Claro);

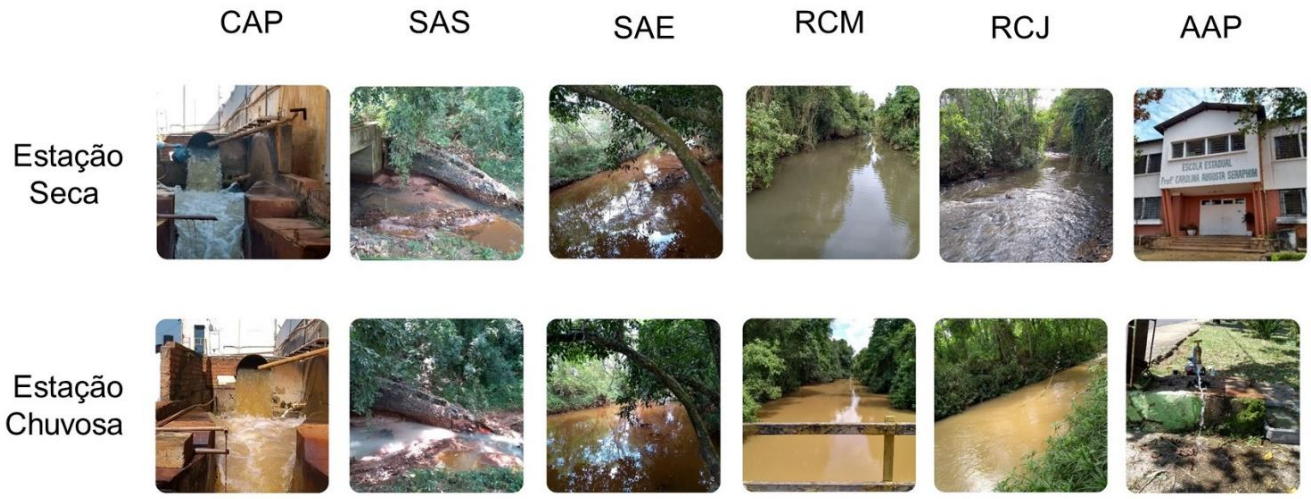
4. RCM – Ribeirão Claro, a montante do recebimento das águas do córrego Santo Antônio contaminadas com o efluente da ETA;

5. RCJ – Ribeirão Claro, a jusante do recebimento das águas do Córrego Santo Antônio contaminada com o efluente da ETA (ponto de mistura completa das águas do Córrego Santo Antônio com o Ribeirão Claro);

6. AAP – Ponto de coleta de amostra de água no cavalete do consumidor água de abastecimento público).

O Córrego Santo Antônio é um corpo d'água canalizado, tendo um ponto de acesso para coleta localizado no final da galeria pluvial. O efluente da ETA também chega até o córrego pela mesma galeria pluvial.

Figura 2 – Imagens dos pontos das coletas de água nas diferentes estações.

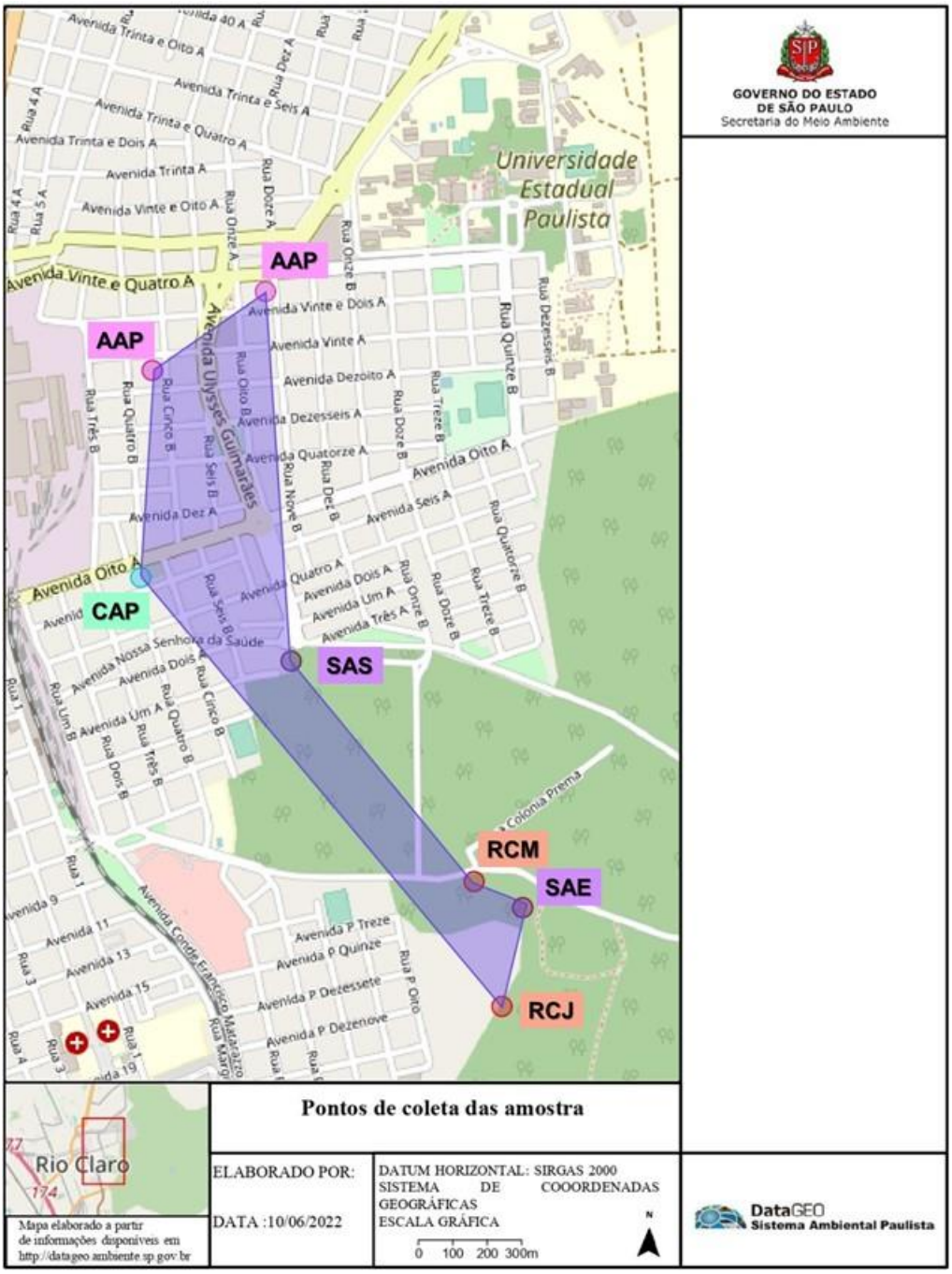


Legenda: Pontos de coletas realizados para avaliação da qualidade da água: **CAP** – Ribeirão Claro – local da captação de água para tratamento pela ETA; **SAS** – Córrego Santo Antônio sem a influência do efluente da ETA; **SAE** – Córrego Santo Antônio contaminadas com o efluente da ETA; **RCM** – Ribeirão Claro, a montante do recebimento das águas do córrego Santo Antônio contaminadas com o efluente da ETA; 5. **RCJ** – Ribeirão Claro, a jusante do recebimento das águas do córrego Santo Antônio (ponto de mistura completa das águas do córrego Santo Antônio com o Ribeirão Claro); 6. **AAP** – água de abastecimento público coletada no cavalete do consumidor.

Figura 3 – Esquema ilustrativo da localização dos pontos de coleta das amostras

Legenda: Pontos de coletas realizados para avaliação da qualidade da água: **CAP** – Ribeirão Claro – local da captação de água para tratamento pela ETA; **SAS** – Córrego Santo Antônio sem a influência do efluente da ETA; **SAE** – Córrego Santo Antônio contaminadas com o efluente da ETA; **RCM** – Ribeirão Claro, a montante do recebimento das águas do córrego Santo Antônio contaminadas com o efluente da ETA; 5. **RCJ** – Ribeirão Claro, a jusante do recebimento das águas do córrego Santo Antônio (ponto de mistura completa das águas do córrego Santo Antônio com o Ribeirão Claro); 6. **AAP** – água de abastecimento público coletada no cavalete do consumidor.

Figura 4 – Localização geográfica dos pontos de coleta



Legenda: Pontos de coletas realizados para avaliação da qualidade da água: **CAP** – Ribeirão Claro – local da captação de água para tratamento pela ETA; **SAS** – Córrego Santo Antônio sem a influência do efluente da ETA; **SAE** – Córrego Santo Antônio contaminadas com o efluente da ETA; **RCM** – Ribeirão Claro, a montante do recebimento das águas do córrego Santo Antônio contaminadas com o efluente da ETA; 5. **RCJ** – Ribeirão Claro, a jusante do recebimento das águas do córrego Santo Antônio (ponto de mistura completa das águas do córrego Santo Antônio com o Ribeirão Claro); 6. **AAP** – água de abastecimento público coletada no cavalete do consumidor.

A água de abastecimento público da última coleta não foi realizada na escola estadual Professora Carolina Augusta Seraphim, pois a campanha de coleta foi feita em um sábado, dia em que a escola se encontra fechada. As amostras do SAE, RCM, RCJ foram coletadas dentro da Floresta Estadual Edmundo Navarro de Andrade (FEENA).

Além do estabelecimento dos pontos de coleta foram estipulados diferentes períodos de coleta. A primeira coleta foi realizada no dia 06 de agosto de 2019 e a segunda coleta no dia 04 de junho de 2020, ambas em período de seca. A terceira coleta foi realizada no dia 20 de fevereiro de 2021, período chuvoso, que é caracterizado por chuvas intensas.

A coleta das amostras foi realizada com balde plástico. As coletas foram do tipo composta, sendo coletadas três sub amostras de cada ponto estudado. As amostras foram acondicionadas em frasco âmbar de 1L, previamente esterilizados e identificados com o nome do ponto e o número da coleta (ANA; CETESB, 2011), levadas para o Laboratório de Mutagênese Ambiental, separadas em alícotas e acondicionadas em tubos centrifuga de 50 mL, para serem utilizadas nos ensaios propostos. Depois de separar as alícotas, o restante do material excedente foi congelado, para usos eventuais.

3.3 Parâmetros físico-químicos

Os parâmetros físico-químicos, aferidos por sonda multiparâmetro (Horiba ®), foram: temperatura (ºC), pH, condutividade (mS/cm), oxigênio dissolvido (mg/L), saturação de oxigênio (%), turbidez (NTU), sólidos totais dissolvidos (g/L) e salinidade (ppt). A sonda foi calibrada, previamente ao uso, conforme indicação do fabricante.

As análises dos parâmetros de fluoreto, fosfato nitrogênio total, DBO (demanda química de oxigênio) e DQO (demanda bioquímica de oxigênio) foram realizadas no Laboratório de Toxicidade do Departamento de Biologia Geral e Aplicada do Instituto de Biociências da Unesp *campus* de Rio Claro. Para essas, foram realizadas coletados específicas, em frascos apropriados para cada parâmetro.

A dosagem de fluoreto foi realizada pelo método de íon seletivo 4500F, conforme descrito por Apha; Awwa; Wef (2017). A dosagem de fosfato foi realizada pelo método Spectro Kit Fosfato Total BC, baseada na digestão da amostra por aquecimento em meio ácido. A determinação da concentração de fosfato das amostras foi determinada pela mudança da intensidade da coloração azul do complexo de molibdênio, pela cor amarela, dada pela redução do fosfomolibdato de amônio.

A presença de nitrogênio total é determinada pelo método de Kjeldahl total (NTK). O método consiste na utilização de uma solução digestora que contem ácido sulfúrico (H_2SO4) e metais (como o cobre), onde o nitrogênio orgânico é convertido em nitrogênio amoniacal ($N\text{-}NH_4$). Uma alíquota da amostra é colocada em um tubo digestor, onde é adicionada a solução digestora, ficando neste tubo até que a digestão esteja completa. Após resfriamento, é adicionado na mistura água e NaOH concentrado, para converter o $N\text{-}NH_4^+$ em NH_3. Na sequência, é submetido a um processo de destilação, titulação (ácido-base), para a determinação da concentração de nitrogênio amoniacal presente na amostra.

A determinação da DBO (demanda bioquímica de oxigênio) se dá pelo método 5210B (APHA; AWWA; WEF, 2017) que define o limite de quantificação (LQ) em 3,8 mg/L. A determinação da DQO (demanda química de oxigênio) é obtida pelo método 5220D colorimétrico de refluxo fechado (APHA; AWWA; WEF, 2017) que define o limite de quantificação (LQ) em 110,1 mg/LO_2.

3.4 Ensaio microbiológico

As análises microbiológicas (coliformes totais, *Escherichia coli*, bactérias heterotróficas e fungos) também foram realizadas no Laboratório de Toxicidade do Departamento de Biologia Geral e Aplicada do Instituto de Biociências da Unesp *campus* de Rio Claro. Para a quantificação de fungos unicelulares e filamentosos são utilizados meios seletivos específicos.

A quantificação dos coliformes totais foi realizada pelo meio de cultura Chromocult Coliform Agar (CCA), que é um meio cromogênico diferencial usado para a quantificação de microrganismos em amostras de água. Cem mL da amostra de água é filtrado em filtros de membrana. Esse filtro é colocado sobre placas de Petri contendo meio CCA. As placas

são incubadas, aerobicamente, e invertidas a 35-37 ºC. A contagem das colônias de coliformes totais é baseada na capacidade da enzima ß-D-galactosidase de clivar o substrato Salmão-GAL, cuja reação produz colônias de coloração vermelho-salmão.

Para a quantificação de termotolerantes/*Escherichia coli* é utilizado o meio de cultura Plate Count Agar (PCA), meio este que também é usado para a quantificação de microrganismos em amostras de água. Cem mL da amostra de água é submetida à filtração em filtros de membrana. Posteriormente esse filtro é colocado sobre placas de Petri contendo meio PCA. As placas são incubadas, aerobicamente, e invertidas a 35-37 ºC para posteriormente serem realizadas as contagens das colônias.

Para a quantificação de bactérias heterotróficas é utilizada a técnica de semeadura em *pour plate*. Em placas de Petri estéreis, 15 a 20 mL de ágar fundido é adicionado sobre a amostra, sendo realizados movimentos rotatórios suaves, para a mistura completa do ágar com a amostra. Em seguida, as placas são incubadas a 35 ºC, por 48 horas, mantendo a umidade dentro da incubadora. Posteriormente, são contabilizadas o número de colônias (UFC/mL). Caso as placas de todas as diluições de uma amostra não exibirem colônias, informa-se a contagem como: 1/ maior amostra correspondente ao volume utilizado. O cálculo da estimativa do número de colônias, pode ser feita multiplicando a soma do número de colônias de um, placa de 13 cm^2 por 5. Quando a placa tem 65 cm^2; multiplica-se a soma do número de colônias em 19 cm^2 por 3. Quando a placa tem 57 cm^2 e quando houver 10 colônias/cm^2, conta-se quadrados e multiplica-se pelo fator apropriado (57 cm^2 ou 65 cm^2), para estimar o número de colônias/placa.

3.5 Ensaio com *Lactuca sativa*

A avaliação do potencial fitotóxico das amostras foi realizada pelo teste de germinação de sementes do bioindicador *Lactuca sativa*. Para o ensaio, foram distribuídas 20 sementes em uma placa de Petri forrada com papel de filtro umedecido com 4 mL da amostra analisada. As placas com as sementes foram incubadas em BOD, sem fotoperíodo, por um período de 120 horas, sob temperatura de 22 ºC (± 2 ºC). Como controle negativo (CN), foi utilizado água destilada e como controle positivo (CP), o sulfato de zinco heptahidratado (0,05M) (SOBRERO; RONCO, 2004). Esse procedimento foi aplicado para as três diferentes coletas. Todos os ensaios com esse organismo teste foi realizado em triplicata

Passado o período de 120 horas, foram contabilizadas as sementes germinadas em cada uma das triplicatas dos tratamentos e dos controles, para posteriormente realizar o cálculo da porcentagem de germinação, conforme a fórmula:

$$\text{Porcentagem de Germinação: } \frac{\text{número de sementes germinadas} \times 100}{\text{número total de sementes}}$$

Os resultados da germinação foram submetidos à análise estatística, utilizando o software GraphPad Prisma 8. Primeiramente, foi realizado o teste de normalidade Shapiro-Wilk ($n < 50$) e o teste de Brown-Forsythe, para a homogeneidade de variância. Como os resultados dos testes apresentaram distribuição normal ($p>0,05$) foi utilizado o teste estatístico ANOVA um fator.

3.6 Ensaio com *Allium cepa*

A avaliação do potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico das amostras coletadas nas três amostragens realizadas no presente estudo foi realizada em meristemas radiculares do bioindicador *Allium cepa*. Para essas análises, 100 sementes desse bioindicador foram dispostas em placas de Petri forradas com papel filtro umedecido com 5 mL da amostra analisada. As placas de Petri com as sementes foram incubadas em BOD, com fotoperíodo de 12h claro/escuro, por um período de 5 dias, em temperatura de 22 ºC (± 2 ºC). Como controle negativo (CN), foi utilizada água destilada, e como controle positivo (CP), o metil metanosulfonato (MMS) a $4x10^{-4}$ (CAS Number: 66-27-3). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

As raízes com cerca de 1,5 cm de comprimento foram coletadas e fixadas em Carnoy (3 partes de etanol para 1 parte de ácido acético – v/v) e armazenadas a 4 ºC, até o momento da confecção das lâminas. Para a preparação das lâminas dos meristemas, primeiramente, as raízes foram submetidas a três banhos em água de osmose reversa, para a retirada do fixador. Na sequência, foram submetidas à hidrólise ácida com HCl 1N a 60 ºC, por 10 minutos, e a três novos banhos em água de osmose reversa. As raízes foram transferidas para frascos âmbar, contendo o Reativo de Schiff, onde ficaram por 2 horas, no escuro, para a Reação de Feulgen. Passadas as 2 horas, as raízes foram submetidas a sucessivas lavagens em água de osmose reversa, até a total retirada do

corante das raízes. Após a coloração das raízes, elas foram utilizadas para a confecção das lâminas. A confecção das lâminas seguiu o protocolo: seccionamento, em lâmina, da região meristemática da raiz, em duas gotas de Carmim Acético 2%; recobrimento do meristema com uma lamínula, seguido de esmagamento suave, para espalhamento das células meristemáticas; retirada da lamínula em nitrogênio líquido. Para a confecção de lâminas permanentes, após a retirada da lamínula, as lâminas foram secas em temperatura ambiente, receberam algumas gotas de resina sintética e, por fim, foram recobertas com nova lamínula. Após secagem da resina, as lâminas foram analisadas em microscopia de luz.

Foram analisadas 12 lâminas por tratamento e contabilizadas 500 células por lâmina, totalizando assim 6000 células meristemáticas por tratamento. A análise se deu pelo registro do número de células em divisão, para a obtenção do Índice Mitótico; registro das alterações cromossômicas observadas nas células, nas diferentes fases do ciclo celular, para a obtenção do Índice de Genotoxicidade; e registros das células portadoras de MN e quebras cromossômicas, para a obtenção do Índice de Mutagenicidade. Os cálculos dos índices de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade foram realizados conforme as fórmulas descritas a seguir:

$$\text{Índice Mitótico (I.M.):} \quad \frac{\text{número de células em divisão} \times 100}{\text{número de células observadas}}$$

$$\text{Índice de Genotoxicidade (I.G.):} \quad \frac{\text{número de células com aberrações cromossômicas} \times 100}{\text{número de células observadas}}$$

$$\text{Índice de Mutagenicidade (I.Mut.):} \quad \frac{\text{número de células com micronúcleo} \times 100}{\text{número de células observadas}}$$

Os dados obtidos nas contagens foram submetidos a análise estatística, utilizando o software GraphPad Prisma 8. Primeiramente, foi realizado o teste de normalidade Shapiro-Wilk ($n < 50$) e o teste de Brown-Forsythe, para a homogeneidade de variância.

Quando os resultados dos testes apresentaram distribuição normal ($p>0,05$) foi utilizado o teste estatístico ANOVA um fator, e quando as amostras não apresentaram distribuição normal ($p<0,05$), foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis.

3.7 Ensaio com cultura de células HepG2/C3A

3.7.1 Preparação das amostras para os ensaios com a linhagem celular HepG2/C3A

As células HepG2/C3A utilizadas neste estudo foram obtidas no Banco de Células do Rio de Janeiro. Para a realização dos ensaios com essa cultura celular, as amostras de água foram submetidas a uma correção do pH (~ 7,2) bem como foram submetidas, em fluxo laminar, ao processo de filtração com filtro com membranas de 0,22 µm. Essa filtração teve como finalidade, principalmente esterilizar a amostra, antes da exposição das células às amostras (ABBAS et al., 2019). As células foram mantidas em frascos de cultura de 25 cm² e cultivadas em 5 mL de meio DMEM (suplementado com 10% de soro fetal bovino e 2% de solução de antibiótico-antimicótico (penicilina 10.000 U.I./mL/ estreptomicina 10 mg/mL, Cultilab) em estufa de 5% de CO_2 a 37 °C, até atingir 80% de confluência.

3.7.2 Ensaio do MTT

O ensaio do MTT foi realizado conforme descrito por Mosmann (1983), com algumas modificações. O meio dos frascos que contém as células foi desprezado e as células foram lavados duas vezes com solução de tampão fosfato salino (PBS). O excesso de PBS foi retirado dos frascos, com o auxílio de uma pipeta Pasteur. Em seguida, foram adicionados 500 µL de tripsina (0,25%), permanecendo no frasco por 5 minutos em incubadora a 5% de CO_2 a 37 °C. Após este período, as células foram despregadas da parede do frasco, por meio de leves batidas. Foram adicionados 2 mL de meio DMEM com soro ao frasco, para inativar a tripsina. Na sequência, foram obtidas as células isoladas em uma suspensão celular homogênea. Em uma câmara de Neubauer foi pipetado 40 µL da suspensão celular, para a contagem de células. A suspensão celular foi centrifugada por 10 minutos a 1500 rpm.

Após a contagem na câmara de Neubauer, foi retirada uma alíquota da suspensão celular, na densidade de 4,6 x 10^4 células por poço da placa de 96 poços (exceto nos poços destinados ao branco). A placa foi incubada em estufa a 37 °C com 5% de CO2, por 24 horas, para a aderência e estabilização das células. Após a estabilização, foram adicionados 200 µL de cada amostra em seus respectivos poços, sendo que foram preparadas 5 diferentes diluições para a realização do teste: 100, 250, 500, 750 e 1000 µL de amostra/mL de meio DMEM incompleto. Para o controle positivo (CP) do teste MTT foi utilizado Triton X-100 a 1% (marca: Impex), diluído em meio DMEM incompleto. Nos poços referentes ao controle negativo (CN) e branco, foi acrescentado apenas meio DMEM incompleto.

Após a adição dos tratamentos, as placas foram mantidas por 24 horas em estufa a 37 °C com 5% de CO_2. Em seguida, foi preparada a solução de MTT [diluição de 0,005 g/placa de MTT (marca: Sigma Aldrich) em 5 mL/placa de PBS) e, em seguida, adicionados 10 mL de meio DMEM incompleto, por placa e 145 µL da solução de MTT em cada poço, seguido de incubação por 3 horas, em estufa a 37 °C com 5% de CO_2, protegidas da luminosidade. Depois das 3 horas de exposição do MTT, o conteúdo da placa foi retirado e foram adicionados 100 µL de DMSO, para a leitura da absorbância por espectrometria, (Infinite M200 Pro - marca Tecan), com filtro de 540 nm. O procedimento foi realizado para todas as amostras nas três coletas.

3.7.3 Ensaio de Viabilidade Celular e Ensaio do Cometa

Para o Ensaio do Cometa, é necessária a realização do teste de viabilidade com o Azul de Trypan. Para a continuidade do ensaio, é necessária uma viabilidade ceda ordem de 80%, entre todas as triplicatas das amostras e dos controles (Negativo e Positivo).

Para a realização do ensaio do cometa, são preparados pré-frascos com suspensão celular de 5 x 10^5 células e 5 mL de meio DMEM completo com soro. Os frascos foram incubados por 24 horas em 5% de CO_2, a temperatura de 37 ºC e com umidade de 80%, para a aderência e estabilização das células aos frascos de cultura. Para este ensaio foi utilizado como Controle Negativo (CN) meio DMEM completo e como Controle Positivo (CP) o MMS (metilmetano sulfonato a 4X10^{-2} M). Passadas as 24 horas de estabilização, foram desprezados os meios de todos os frascos; as células foram lavadas, por 2X, em

PBS e retirado o excesso de PBS. No frasco das amostras foram adicionados 1 mL das amostras (correspondente a 20%) e 4 mL de meio DMEM completo, nos do CN 5 mL de meio DMEM completo e no do CP 50 µL de MMS e 4950 µL de meio DMEM completo. As células ficaram expostas aos a esses tratamentos por 24 horas.

Passado esse tempo, os meios foram descartados, as células lavadas com 5 mL de PBS, por duas vezes e o excesso de PBS retirado. Foi adicionado aos frascos 500 µL de Tripsina a 0,5% por 5 min, para o desprendimento das células da parede dos frascos. A Tripsina foi inativada pela adição de 5 mL de meio completo. Foi utilizado a seringa de 1 mL para desfazer os grumos das células e obter células individualizadas. Posteriormente, a suspensão celular foi transferida para tubos de centrifuga de 15 mL e centrifugada por 5 min, a 1500 rpm. Após a centrifugação, foi retirado o sobrenadante, usando uma pipeta Pasteur de vidro, deixando no frasco um volume de meio de 0,5 mL. O material do frasco foi homogeneizado, para ser usado na confecção das lâminas do Azul de Trypan (teste viabilidade celular).

Para o teste de viabilidade celular com o Azul de Trypan, foi retirado 20 µL de suspensão celular (de cada frasco), que foi misturado, em tubo de centrífuga, com 20 µL de Azul de Trypan. Os 40 µL foram transferidos para uma lâmina, que foi usada para contabilizar, sob microscopia de luz, 100 células, dentre elas as brancas (células vivas) e as azuis (células mortas), para cada uma das réplicas dos tratamentos. Após a contabilização, foi verificado se as células apresentaram viabilidade igual ou superior a 80%, necessária para dar continuidade ao ensaio do cometa.

Para a confecção das lâminas do ensaio do cometa, foram misturados 40 µL de suspensão celular e 240 µL de agarose LMP (baixo ponto de fusão). Desta mistura, 120 µL foram distribuídos em 2 lâminas, previamente identificadas e gelatinizadas com agarose. A lâmina foi recoberta com lamínula e acondicionadas em geladeira, por 15 min, para a solidificação do material (células e agarose LMP). Após a solidificação, as lamínulas foram retiradas das lâminas, e as lâminas colocadas em solução de lise contendo 10 mL de DMSO, 1 mL de Triton X-100 e 89 mL de solução de lise estoque (preparada com 73,05 g de NaCl; 18,6 g de EDTA; 0,6 g de Tris diluídos em 445 mL de água deionizada, calibrado com pH 10,0), por 1 hora. Posteriormente, as lâminas foram acondicionadas na cuba de eletroforese, contendo o tampão de corrida alcalino gelado (5 mL de EDTA 200 mM; 30 mL de NaOH 10N e 1000 mL de água deionizada). As lâminas foram dispostas

na cuba de eletroforese, por 20 minutos, para a estabilização e desnaturação do DNA e, depois da corrida em eletroforese a 39V, 300 mA, permaneceram na cuba por mais 20 min. Na sequência, as lâminas foram retiradas da cuba e colocadas em uma cubeta de vidro preenchida com solução de neutralização (24,25 g Tris em 475 mL de água deionizada com pH de 7,5), por 5 minutos, sendo esse procedimento repetido por 3 vezes. As lâminas foram, então fixadas com etanol P.A., por 10 minutos. As lâminas foram coradas com GelRed (50 µL) e avaliadas em microscópio de fluorescência. Para a leitura das lâminas, foi utilizado software Comet Assay IV. Foram analisados 100 nucleóides por réplica (50 nucleóides por lâmina), totalizando 300 nucleóides por tratamento. O parâmetro analisado pelo software foi o de intensidade da cauda (*tail intensity*) (OECD, 2016b), cujos resultados da leitura passaram por retirada de *outliers* (SOUZA et al., 2020), para depois serem submetidos a análise estatística. A análise estatística, passou, primeiramente, pelo teste de normalidade Shapiro-Wilk ($n < 50$) e pelo teste de homogeneidade de variância Brown-Forsythe. Quando os resultados dos testes apresentaram distribuição normal ($p>0,05$) foi utilizado o teste estatístico ANOVA um fator, e quando as amostras não apresentaram distribuição normal ($p<0,05$), foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis.

3.7.4 Ensaio do Micronúcleo com Bloqueio de Citocinese (MN)

O ensaio do Micronúcleo com bloqueio de citocinese (MN) seguiu, nas primeiras etapas dos procedimentos (preparação dos pré-frascos e concentração da substância usada no controle positivo) as mesmas metodologias descritas no item 3.7.3, para o ensaio do cometa, com algumas modificações: 1. Alteração no preparo do pré-frasco, sendo colocado, no Ensaio do Cometa, $5X10^5$ células, enquanto que no ensaio do MN, foram colocadas $2X10^6$ células; 2. Alteração da concentração do controle positivo, onde a concentração de MMS usada nos ensaios foi de $4x10^{-2}$ M, para o Ensaio do Cometa e de $1,06X10^{-3}$ M para o ensaio do MN.

No ensaio do MN, após as 24 horas de exposição aos tratamentos, o meio de cultura contendo o tratamento foi desprezado e as células lavadas em 5 mL de PBS, por duas vezes. Foi adicionado aos frascos 4950 µL de meio DMEN completo e 50 µL de Citocalasina-B (300 µg/mL). Os frascos de cultura foram, novamente, acondicionados em incubadora a 5% de CO_2, a temperatura de 37ºC e com umidade de 80%, por 30 horas.

Após 30 horas de ação da Citocalasina-B, foram realizadas as coletas da suspensão celular. Primeiramente, o meio de cultura foi transferido para frascos de centrifuga de 15 mL; os frascos contendo as células foram lavados com 5 mL de PBS, por duas vezes, sendo, posteriormente, retirado o excesso de PBS; foi adicionado 500 µL de Tripsina a 0,5%, por 5 min, para o despregamento das células da parede dos frascos; a Tripsina foi inativada pelo meio anteriormente armazenado em frasco de centrífuga de 15 mL (na etapa anterior). Para auxiliar na retirada do maior número possível de células das paredes dos frascos, dissociar os grumos celulares e transferir, novamente, o conteúdo do frasco para o tubo de centrífuga de 15 mL, foi utilizada uma a seringa de 1 mL. O tubo foi centrifugado por 5 min a 1500 rpm e, após a centrifugação, foi retirado o sobrenadante, usando uma pipeta Pasteur de vidro, deixando um volume no tubo de até 0,5 mL. O material foi homogeneizado, misturado com 5 mL de Citrato de Sódio a 1% (1 g de citrato de sódio diluído em 100 mL deionizada), novamente homogeneizado, delicadamente por 40 vezes. Após 5 minutos da homogeneização, foram adicionadas 2 gotas de Formol e novamente homogeneizado. Posteriormente, os tubos foram novamente centrifugados por 5 minutos a 1500 rpm, o sobrenadante retirado até atingir um volume de 0,5 mL e, mais uma vez a homogeneizado, delicadamente. Foi adicionado no tubo 5 mL de Carnoy (etanol e ácido acético na proporção 3:1; v/v), a mistura foi homogeneizado delicadamente, e os tubos acondicionados a 4 ºC.

Para a confecção das lâminas, os tubos foram retirados da geladeira e centrifugados a 1500 rpm por 5 min. O sobrenadante foi retirado com o auxílio de uma pipeta Pasteur de vidro, deixando no tubo um volume de aproximadamente 0,5 mL. A suspensão obtida foi homogeneizada. Em uma lâmina previamente lavada, foram pingadas algumas gotas da suspensão celular e, em seguida, a lâmina foi passada pela, chama para a fixação do material. Para a coloração das células, as lâminas foram submetidas a uma hidrólise ácida, com HCl 1N por 10 min a 60ºC, depois colocadas em uma cuba contendo o Reativo de Schiff, por 2 horas. Passado esse período, as lâminas floram deixadas para secar em temperatura ambiente, para depois serem coradas com Giemsa (3% de Giemsa, 2% de metanol, completado com tampão Sorense para 100 mL).

A análise das lâminas do ensaio do Micronúcleo foi realizada em objetiva de 100X de microscópio de luz. Foram avaliadas 500 células (mononucleadas, binucleadas e multinucleadas), para a obtenção do CBPI por réplica, totalizando 3000 células por tratamento. Além disso, foram analisadas 1000 células binucleadas por réplica ou 6000

células por tratamento, em que foram observadas alterações como micronúcleo, broto nucleares, pontes nucleoplasmáticas e alterações compostas (células com micronúcleo e ponte; MN e broto ou ponte e broto), para a determinação do potencial genotóxico da amostra testado. Tal procedimento foi aplicado para as três coletas.

Os dados de CBPI e das alterações cromossômicas foram submetidos a análise estatística, primeiramente pelo teste de normalidade Shapiro-Wilk ($n < 50$) e o teste de homogeneidade de variância Brown-Forsythe. Quando os resultados dos testes apresentaram distribuição normal ($p>0,05$), foi utilizado o teste estatístico ANOVA um fator, e quando as amostras não apresentaram distribuição normal ($p<0,05$), foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis.

4 Resultados

Artigo 1: Impactos físico-químicos, microbiológicos e fitotóxicos causados por efluentes não tratados de Estação de Tratamento de Água, sobre os corpos hídricos receptores

Autores: Gigeck, Letícia de Souza; Sommaggio, Laís Roberta Deroldo; da Silva, Adriana Fabiana Corrêa; Nalin, Dilza Aparecida; de Angelis, Dejanira de Franceschi; Marin Morales, Maria Aparecida

Artigo 2: Avaliação dos impactos de efluentes não tratados de Estação de Tratamento de Água (ETA) sobre corpos hídricos receptores, por meio de bioensaios com Células HepG2 / C3A

Participantes: Gigeck, Letícia de Souza; da Silva, Adriana Fabiana Corrêa; Gonçalves, Letícia Rocha; Sommaggio, Laís Roberta Deroldo; Marin Morales, Maria Aparecida

Artigo 1: Impactos físico-químicos, microbiológicos e fitotóxicos causados por efluentes não tratados de Estação de Tratamento de Água, sobre os corpos hídricos receptores

Gigeck, Letícia de Souza[1]; Sommaggio, Laís Roberta Deroldo[1]; da Silva, Adriana Fabiana Corrêa[1]; Nalin, Dilza Aparecida[1]; de Angelis, Dejanira de Franceschi[1]; Marin Morales, Maria Aparecida[1]

[1]UNESP – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Departamento de Biologia Geral e Aplicada, Instituto de Biociências, Avenida 24A, nº 1515, CEP: 13506-900, Rio Claro, São Paulo, Brasil.
Autor correspondente: marin.morales@unesp.br

RESUMO

Apesar da grande importância dos recursos hídricos para a vida, eles vêm sendo constantemente impactados por uma infinidade de compostos com potencial tóxico. A água de abastecimento público deve passar por tratamentos que assegurem a sua qualidade, antes de ser disponibilizada para a população. Esses tratamentos de purificação química e desinfecção da água são realizados em Estações de Tratamento de Água (ETA), que aplicam uma série de processos e etapas para atingir a potabilidade da água. Os processos de tratamento usados nas ETA também geram resíduos que, se não tratados adequadamente, podem contaminar os recursos onde são descartados. A ETA da cidade de Rio Claro (SP) lança os resíduos derivados da lavagem dos filtros e decantadores, em corpos hídricos (Córrego Santo Antônio e Ribeirão Claro), sem tratamento prévio. O presente estudo avaliou a qualidade da água dos corpos receptores do efluente da ETA, bem como da água destinada ao consumidor. Foram realizados ensaios físico-químicos, análise das variáveis microbiológicas da água e bioensaios com as espécies vegetais *Lactuca sativa* e *Allium cepa,* com amostras de água de três coletas, sendo duas no período de seca e uma no período de chuva. Os pontos de coleta foram: água de captação da ETA (CAP); água do Córrego Santo Antônio sem o lançamento do efluente da ETA (SAS); água do Córrego Santo Antônio com o lançamento do efluente da ETA (SAE); amostra a montante do recebimento do efluente da ETA no Ribeirão Claro; (RCM); amostra a jusante do lançamento do efluente da ETA coletada no Ribeirão Claro

no ponto de mistura completa (RCJ); água do cavalete do consumidor (AAP). No Córrego Santo Antônio foram observados elevados níveis de condutividade, baixa concentração de oxigênio, aumento da turbidez, salinidade, fosfato, nitrogênio total, DBO e no SAS valores elevados de DQO, bem como uma maior presença de coliformes totais, *E. coli,* bactérias heterotróficas e fungos, em relação aos parâmetros estabelecidos pela legislação vigente. Já com relação ao Ribeirão Claro, foi observado aumento do pH e da condutividade e baixos níveis de oxigênio dissolvido, para a primeira coleta, aumento de fosfato para a primeira e segunda coleta no RCJ, alta do nitrogênio total na terceira coleta no RCJ, valore altos de DBO e DQO (RCM nas duas primeiras coletas), bem como uma maior presença de coliformes totais, *E. coli* e bactérias heterotróficas, em relação aos parâmetros estabelecidos pela legislação vigente. A água de abastecimento público se mostrou fora dos padrões estabelecidos pela portaria de potabilidade da água. As amostras analisadas no presente estudo não foram fitotóxicas para o organismo teste *L. sativa*. Os bioensaios com *A. cepa* mostraram citotoxicidade para o AAP, RCM e RCJ (segunda coleta); genotoxicidade para o AAP (segunda e terceira coleta), sendo que na última coleta o SAS, SAE, RCM e RCJ também apresentaram potencial genotóxico. Com relação ao potencial mutagênico das amostras de água avaliadas, somente o AAP foi mutagênico (segunda coleta). Os resultados mostraram que ambos os recursos hídricos contêm substâncias capazes de alterar a qualidade de sua água. Pelos resultados obtidos, pode-se inferir que o aporte de substâncias tóxicas aos recursos hídrico se dá, mais intensamente, por carreamento de poluentes principalmente, nos períodos de alta pluviosidade. O presente estudo reforçou a eficiência dos bioindicadores *L. sativa* e *A. cepa* para serem usados em monitoramento ambiental e avaliações da qualidade da água a ser destinada ao uso público.

Palavras-chaves: *Allium cepa*; *Lactuca sativa*; fitotoxicidade; citotoxicidade; genotoxicidade; poluição hídrica.

1. Introdução

Os recursos hídricos vêm sofrendo, há muito tempo, impactos severos em sua qualidade, devido a descartes de resíduos de diferentes atividades humanas. O comprometimento desse importante recurso mineral representa um grande perigo à qualidade ambiental e, consequentemente, à saúde humana. Destacam-se dentre os resíduos de origem urbana que mais poluem os corpos hídricos, aqueles derivados de estações de tratamentos de água e de esgoto que, muitas vezes, são lançados *in natura* ou ineficientemente tratados. Para minimizar os impactos ambientais causados pelas atividades urbanas, seria importante melhorar a infraestrutura urbana, bem como aplicar boas práticas de gestão dos seus resíduos.

As Estações de Tratamento de Água (ETA) são responsáveis por tratar a água bruta retirada de recursos hídricos, para que a mesma possa ser destinada, com segurança, ao consumo humano. As ETA devem aplicar processos de tratamento que garantam a remoção de microrganismos patogênicos; diminuição das substâncias orgânicas ou inorgânicas; redução da cor, odor, sabor e turbidez, parâmetros esses essenciais para garantir os padrões de potabilidade estabelecidos pela legislação vigente (DE PÁDUA, 2010). No Brasil, esses padrões de potabilidade da água para consumo público estão descritos na Portaria GM/MS nº 888 de 2021 (BRASIL, 2021) que altera a Portaria de Consolidação nº 5 de 2017 em seu Anexo XX (BRASIL, 2017), e na Resolução do CONAMA Nº 357 (BRASIL, 2005).

As ETA utilizam nos tratamentos várias barreiras sanitárias, bem como técnicas que retirem os mais variados contaminantes da água bruta. Mas, além dos cuidados com a água que será disponibilizada à população, as ETA também devem estar atentas à proteção dos mananciais onde a água é captada (REALI; PAZ; DANIEL, 2013), bem como com os impactos que os seus efluentes possam causar ao corpo hídrico receptor.

O processo de tratamento empregado pela ETA depende das características e qualidade do recurso hídrico onde a captação irá ocorrer (ROSARIO, 2007). A ETA de Rio Claro (SP) faz sua captação no Ribeirão Claro e adota o processo de tratamento convencional para o tratamento da sua água captada. Esse processo de tratamento convencional é realizado pelas etapas de floculação, decantação (RICHTER, 2009; DE PÁDUA, 2010), filtração (LIBÂNIO, 2010), desinfecção e fluoretação (DAAE – Rio Claro, 2022).

A primeira etapa de tratamento da ETA é a de pré-cloração. Nesta etapa, a água captada recebe cloro para a desinfecção da água bruta. A cloração também auxilia no controle do crescimento de algas; permite uma melhor floculação, pois aumenta o potencial de coagulação; oxida substâncias presentes na água, o que auxilia na degradação de poluentes (MA et al., 2012; QI et al., 2016; DIAS; LIBRANTZ; DOS SANTOS, 2020).

Como as águas brutas apresentam partículas suspensas na coluna d'água, são adicionados à água captada compostos coagulantes (no caso da ETA, o cloreto férrico), que promovem a agregação dessas partículas (processo de coagulação). A água captada, assim que chega na ETA, recebe o coagulante e segue para os tanques de coagulação. Passa por agitação mecânica, para aumentar ainda mais a eficiência do processo de coagulação, formando flocos grandes e pesados (floculação), que se depositam no fundo dos tanques (decantação). Esse material decantado forma um lodo, que é removido dos tanques, periodicamente, durante a lavagem dos decantadores. Esse efluente da lavagem é descartado *in natura* na galeria de água pluvial, que segue para o Córrego Santo Antônio, um afluente do Ribeirão Claro. A água tratada neste processo citado, já livre de impurezas, passa então para as outras etapas do tratamento (filtração, desinfeção e fluoretação).

Na etapa de filtração, a água passa por diferentes filtros (cascalho, areia grossa, areia fina e carvão), que retém os flocos que não decantaram, e removem outros resíduos menores, o que torna o processo posterior (desinfecção) mais eficiente, bem como corrigi algumas falhas dos processos anteriores (LIBÂNIO, 2010; CLARK, 2011; GOMES, 2012). Na desinfecção, a água tratada recebe adição de compostos químicos, para a eliminação de agentes patogênicos, como bactérias e vírus. Nessa etapa, as ETA podem também associar aos tratamentos químicos, tratamentos com radiação (UV) e/ou ozonização (SRIVASTAV; PATEL; CHAUDHARY, 2020). A ETA de Rio Claro-SP utiliza apenas tratamento químico (cloro gás). O último passo do tratamento, antes da distribuição para a população, consiste na adição de flúor à água, processo este recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS), como adjuvante na prevenção de cáries dentárias (MOIMAZ et al., 2020).

O Artigo 24 da Resolução do CONAMA nº 357 de 2005 (BRASIL, 2005) diz que qualquer efluente lançado diretamente ou indiretamente em um corpo d'água deve receber

tratamento prévio e seguir os protocolos padrões pré-estabelecidos. Também cita que é de obrigatoriedade do órgão ambiental competente controlar as condições e os parâmetros do efluente que garantam a eficiência do tratamento recebido, antes do mesmo ser descartado. Essas diretrizes têm como finalidade evitar que o lançamento irregular dos resíduos nos corpos d'água promovam alterações dos parâmetros físico-químicos, bem como apresentem potencial tóxico para o meio. É de extrema importância avaliar como o descarte dos efluentes de ETA pode impactar os corpos hídricos receptores e também estabelecer estratégias que visem melhorias para um descarte seguro desses resíduos.

Os bioensaios são essenciais para uma ampla análise de riscos ambientais, por isso muito úteis na avaliação da biodisponibilidade das substâncias presentes em amostras ambientais. Um dos bioindicadores mais utilizados em análise ambiental é a espécie *Lactuca sativa* (alface). Ensaios realizados com este organismo permitem um rápido e eficiente diagnóstico de fitotoxicidade, devido à sua rápida germinação e sua alta sensibilidade a diferentes contaminantes (KOHATSU et al., 2018). Um bioindicador muito utilizado para o diagnóstico de citogenotoxicidade é a espécie *Allium cepa* (cebola), sendo também muito utilizada em monitoramento ambiental (CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008; MANZANO et al., 2015; HARA; MARIN-MORALES, 2017). A espécie *A. cepa* apresenta parâmetros interessantes para esse tipo de análise, devido às suas características citogenéticas, tais como cromossomos grandes e em número reduzido (2n=16), o que facilita a observação de alterações durante o ciclo celular (FISKESJÖ, 1985); à sua alta sensibilidade a agentes tóxicos; e sua alta correlação de resposta com outros organismos, como, por exemplo, os mamíferos (LAUGHINGHOUSE, 2012). Esses organismos testes citados são amplamente indicados para serem usados, em conjunto, em avaliações de impactos de descarte de efluentes em corpos d'água, como os de ETA.

Este estudo teve como objetivo avaliar a eficiência do tratamento realizado por uma das ETA de uma cidade com cerca de 200 mil habitantes e os impactos físico-químicos e ecotoxicológicos (fitotoxicidade e citogenotoxicidade, pelos ensaios com *L. sativa* e com *A. cepa*, respectivamente) que o descarte *in natura* do efluente desta ETA pode promover nas águas dos rios receptores.

2. Material e Método

2.1 Características da ETA Estudada

A ETA utiliza em seu processo de remoção de impurezas e desinfecção o sistema de tratamento convencional (floculação, decantação, filtração, desinfecção e fluoretação). A captação de água é feita no Ribeirão Claro enquadrado como rio de Classe II, conforme Resolução CONAMA 357, órgão consultivo e deliberativo de meio ambiente brasileiro.

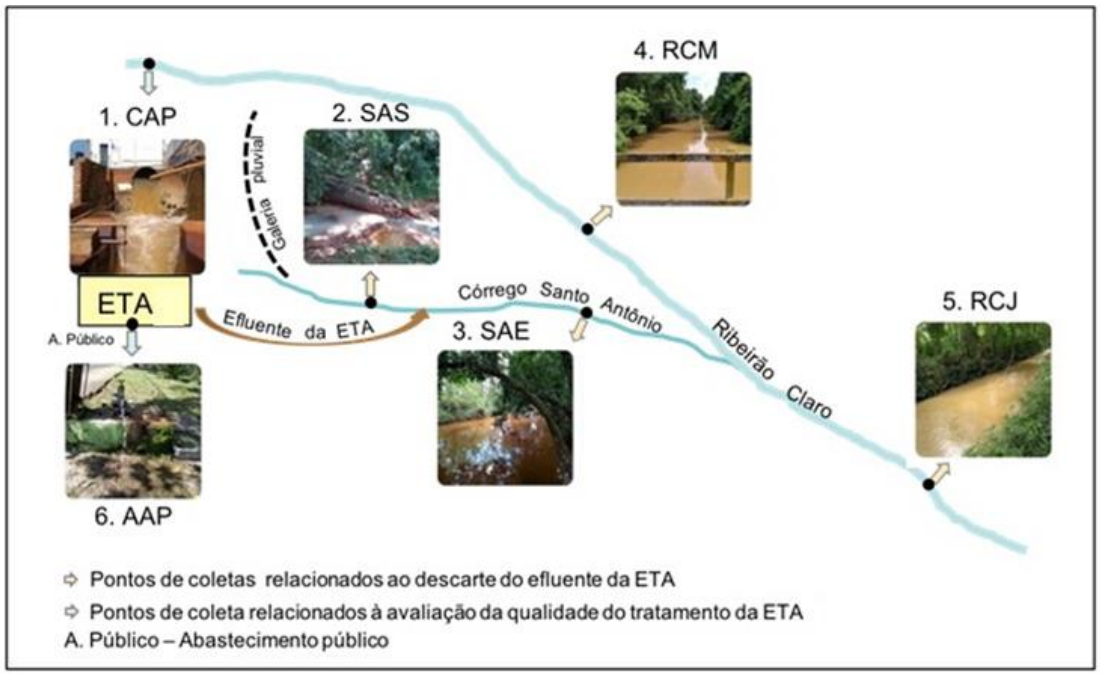
A ETA tem como características de tratamento a correção do pH com cal hidratada; o cloreto férrico como agente coagulante; a pré-cloração e desinfecção feita com o gás cloro; floculação hidráulica, decantação convencional; filtração do tipo rápida (filtros de cascalho, areia grossa e areia fina); e fluoretação automática (Relatório ARESPCJ, 2015). A ETA não adota nenhum processo de tratamento ou desidratação do lodo gerado, descartando todo efluente da estação de tratamento, *in natura*, no Córrego Santo Antônio, um afluente do Ribeirão Claro.

2.2 Pontos de Coleta

Para avaliação da qualidade das águas dos rios relacionados com a captação e descarte de efluentes da ETA, bem como da qualidade do tratamento, foram estabelecidos 6 diferentes pontos de coleta de amostras de água (Figuras 1 e 2), como segue: 1. CAP – ponto de captação da ETA; 2. SAS – Córrego Santo Antônio, cujas águas estão sem a influência do efluente da ETA; 3. SAE – Córrego Santo Antônio, cujas águas já tem a influência do efluente da ETA (este ponto está localizado 100 m antes da confluência do córrego com o Ribeirão Claro); 4. RCM – Ribeirão Claro, antes do recebimento das águas do córrego Santo Antônio contaminadas com o efluente da ETA; 5. RCJ – Ribeirão Claro, a jusante do recebimento das águas do Córrego Santo Antônio contaminada com o efluente da ETA (ponto de mistura completa das águas do Córrego Santo Antônio com o Ribeirão Claro); 6. AAP – ponto de coleta de amostra de água no cavalete do consumidor. A amostragem deste último ponto foi realizada, nas duas primeiras coletas, na Escola Estadual Professora Carolina Augusta Seraphim e, na terceira coleta, na praça da Avenida Ulisses Guimarães, situada entre as Avenidas 24 e 22, Vila Indaiá, Rio Claro – SP (Figura 1).

A água de abastecimento público da última coleta não foi realizada na escola estadual Professora Carolina Augusta Seraphim, pois a campanha de coleta foi feita em um sábado, dia em que a escola se encontra fechada. As amostras do SAE, RCM, RCJ foram coletadas dentro da Floresta Estadual Edmundo Navarro de Andrade (FEENA).

Figura 1 – Esquema ilustrativo dos pontos de coletas



Legenda: Pontos de coletas realizados para avaliação da qualidade da água: **CAP** – Ribeirão Claro – local da captação de água para tratamento pela ETA; **SAS** – Córrego Santo Antônio sem a influência do efluente da ETA; **SAE** – Córrego Santo Antônio contaminadas com o efluente da ETA; **RCM** – Ribeirão Claro, a montante do recebimento das águas do córrego Santo Antônio contaminadas com o efluente da ETA; 5. **RCJ** – Ribeirão Claro, a jusante do recebimento das águas do córrego Santo Antônio (ponto de mistura completa das águas do córrego Santo Antônio com o Ribeirão Claro); 6. **AAP** – água de abastecimento público coletada no cavalete do consumidor.

Todas as amostragens realizadas nas três coletas seguiram os protocolos estabelecidos e dispostos no Manual de coleta de amostras da ANA e CETESB (ANA; CETESB, 2011). As amostras obtidas foram separadas em alíquotas, acondicionadas em tubos de centrifuga de 50 mL e armazenadas a -4 ºC até seu uso nos ensaios.

As coletas de amostras de água dos pontos descritos, foram realizadas sempre após a lavagem do decantador e dos filtros da ETA. A primeira e segunda coletas foram realizadas no inverno (06 de agosto de 2019 e 04 de junho de 2020, respectivamente), período este que, no Sudeste (SE) brasileiro, se caracteriza como de período de seca. A terceira coleta (20 de fevereiro de 2021) já foi realizada no verão, estação esta que se

caracteriza como de período chuvoso, com chuvas intensas. Os dados de precipitação das respectivas campanhas de coletas estão apresentados na Tabela 1. Esses dados foram obtidos junto ao Centro de Análise e Planejamento Ambiental (CEAPLA), do Instituto de Geociências e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho *campus* de Rio Claro (Tabela 1).

Tabela 1 – Dados mensais de precipitação, em mm^3, dos anos de 2019, 2020 e 2021

Meses	**Anos**		
	2019	**2020**	**2021**
Janeiro	156,8 mm^3	175,0 mm^3	250,8 mm^3
Fevereiro	381,8 mm^3	315,0 mm^3	**198,9 mm^3 ***
Março	156,5 mm^3	128,4 mm^3	105,3 mm^3
Abril	205,3 mm^3	8,4 mm^3	11,6 mm^3
Maio	31,6 mm^3	23,6 mm^3	28,9 mm^3
Junho	11,3 mm^3	**79,2 mm^3 ***	30,5 mm^3
Julho	25,6 mm^3	8,2 mm^3	21,4 mm^3
Agosto	**13,8 mm^3 ***	34,2 mm^3	9,0 mm^3
Setembro	56,0 mm^3	12,0 mm^3	7,4 mm^3
Outubro	126,4 mm^3	68,7 mm^3	236,1 mm^3
Novembro	171,1 mm^3	107,4 mm^3	97,5 mm^3
Dezembro	151,5 mm^3	244,5 mm^3	160,9 mm^3

Legenda: Os valores em negrito e com * correspondem aos dados de precipitação em mm^3 referentes ao mês e ano das coletas de amostras. 1ª Coleta: 06/08/2019; 2ª Coleta: 04/06/2020; 3ª Coleta: 20/02/2021.

2.3 Parâmetros físico-químicos obtidos com a sonda multiparâmetro

Os parâmetros físico-químicos das amostras foram aferidos com sonda multiparâmetro Horiba® no local de coleta ou nas dependências do Laboratório de Mutagênese Ambiental, Instituto de Biociências da Unesp campus de Rio Claro. Foram aferidos os parâmetros: temperatura (ºC), pH, condutividade (mS/cm), oxigênio dissolvido (mg/L), turbidez (NTU), sólidos totais dissolvidos (g/L) e salinidade (ppt).

As análises dos parâmetros fluoreto, fosfato, nitrogênio total, DBO (demanda química de oxigênio) e DQO (demanda bioquímica de oxigênio) foram realizadas no Laboratório de Toxicidade do Departamento de Biologia Geral e Aplicada do Instituto de Biociências da Unesp campus de Rio Claro.

2.4 Ensaios Microbiológicos

As análises microbiológicas (coliformes totais, *Escherichia coli*, bactérias heterotróficas e fungos) foram realizadas no Laboratório de Toxicidade do Departamento de Biologia Geral e Aplicada do Instituto de Biociências da Unesp *campus* de Rio Claro. Para a quantificação dos coliformes totais, foi utilizado o meio de cultura *Chromocult Coliform Agar* (CCA). A quantificação de *Escherichia coli* foi feita com a utilização do meio de cultura *Plate Count Agar* (PCA), a das bactérias heterotróficas pela técnica de semeadura em *pour plate* e para a quantificação de fungos unicelulares e filamentosos foram utilizados meios seletivos distintos.

2.5 Bioensaio de fitotoxicidade com *Lactuca sativa*

Para o ensaio com *Lactuca sativa*, foram distribuídas 20 sementes do bioindicador em placa de Petri forrada com papel de filtro umedecido com 4 mL das amostras. O ensaio foi realizado em triplicata e as placas de Petri foram incubadas em BOD (22 ºC ± 2 ºC) no escuro, por 120 horas. O controle negativo (CN) foi realizado com água destilada e o controle positivo (CP) com sulfato de zinco heptahidratado ($ZnSO_4$) a 0,05M (SOBRERO; RONCO, 2004). Após as 120 horas de exposição, foram contabilizadas as sementes germinadas, que foram usadas no cálculo da porcentagem de germinação, seguindo a fórmula:

$$\%\ germinação = \frac{número\ de\ sementes\ germinadas}{Total\ de\ sementes\ expostas}$$

Os resultados do ensaio de germinação foram submetidos às análises estatísticas pelo software GraphPad Prisma 8. Primeiramente, foi realizado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk (n < 50), seguido pelo teste de homogeneidade de variância de Brown-Forsythe. Como os resultados apresentarem distribuição normal e foram homogêneos, foi realizado o teste estatístico ANOVA.

2.6 Bioensaio com *Allium cepa*

Para os bioensaios de citogenotoxicidade, foram dispostas 100 sementes de *Allium cepa* (variedade baia periforme) em placas de Petri forradas com papel filtro umedecidas com 5 mL das amostras. Os ensaios foram realizados em triplicata (3 placas para cada

amostra estudada). O controle negativo (CN) foi realizado com água destilada e o controle positivo (CP) com metil metano sulfonato (MMS) a $4x10^{-4}$ (CAS Number: 66-27-3).

As placas foram incubadas em BOD a 22 ºC (± 2 ºC), com fotoperíodo de 12 h, por 5 dias. Foram avaliados os parâmetros de citotoxicidade, genotoxicidade e potencial mutagênico em células de meristemas radiculares. Para esses ensaios, as raízes com cerca de 1,5 cm foram coletadas, fixadas em Carnoy (3 partes de etanol PA para 1 parte de ácido acético PA – v:v) e armazenadas sob refrigeração a 4 ºC, até serem usadas na confecção das lâminas.

Para a confecção das lâminas, as raízes foram submetidas a hidrólise ácida com HCl 1N a 60ºC, por 10 minutos, e depois transferidas para frascos contendo o Reativo de *Schiff*, onde permaneceram por 2 horas no escuro, (Reação de Feulgen). A região meristemática das raízes foi disposta em lâmina e seccionada em 2 gotas de Carmim Acético 2%. Em seguida, o material foi recoberto com lamínula, sendo suavemente esmagado, para o espalhamento das células. As lamínulas foram extraídas em nitrogênio líquido e as lâminas secas em temperatura ambiente. O material fixado nas lâminas recebeu 1 gota de resina sintética, sendo, imediatamente, recoberto por uma nova lamínula, para serem, posteriormente, analisadas em microscopia de luz (Aumento de 400x). Foram contabilizadas 6000 células meristemáticas por tratamento (500 células de 12 lâminas/tratamento). O índice mitótico (parâmetro de citotoxicidade) foi calculado pelo número de células em divisão/total de células analisadas; o índice genotóxico foi calculado pelo número de células portadoras de alterações cromossômicas/número total de células contabilizadas; e o potencial mutagênico pelo número de células com micronúcleos ou quebras cromossômicas/ número de células contabilizadas.

Os dados obtidos nas contagens foram submetidos a análise estatística, utilizando o software GraphPad Prisma 8. Primeiramente, foi realizado o teste de normalidade Shapiro-Wilk ($n < 50$) e o teste de Brown-Forsythe, para a homogeneidade de variância. Quando os resultados dos testes apresentaram distribuição normal ($p>0,05$) e homogeneidade de variâncias, foi utilizado o teste estatístico ANOVA um fator, e quando as amostras não apresentaram distribuição normal ($p<0,05$), foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis.

3. Resultados e Discussão

3.1 Parâmetros físico-químicos e microbiológicos

Resíduos produzidos pelas ETA durante a lavagem dos filtros e dos decantadores (lodo do decantador) devem ser tratados, para que possam ser descartados com segurança no meio ambiente, pois os mesmos são potencialmente tóxicos. No entanto, a maioria das ETA não realiza o tratamento desses resíduos de forma adequada, ou até os laçam sem tratamento prévio em corpos hídricos ou em locais próximos às estações de tratamento (SANTOS; MICHELAN; JESUS, 2021).

A ETA da cidade de Rio Claro-SP descarta o lodo do seu decantador em um recurso hídrico de pequeno porte próximo da ETA (Córrego Santo Antônio), impacto esse que segue para um outro importante rio da região (Ribeirão Claro). Por essa razão, existe a necessidade de se avaliar os impactos que esses resíduos promovem nesses corpos hídricos receptores. Para isso, é prudente que, além dos ensaios de toxicidade, sejam também avaliados os impactos desses corpos hídricos, quanto aos seus parâmetros físico-químicos.

Os parâmetros físicos e químicos utilizados rotineiramente para monitoramento da qualidade de águas são pH, temperatura, demanda química de oxigênio (DQO), oxigênio dissolvido (OD) e demanda bioquímica de oxigênio (DBO) (OLIVEIRA; SANTOS; BOEIRA, 2012). No entanto, existem outros parâmetros que também podem estar relacionados com problemas de contaminação ambiental. No presente estudo foram avaliados os parâmetros de pH, temperatura, condutividade, oxigênio dissolvido, turbidez, sólidos totais dissolvidos (STD) e salinidade, por meio da utilização da sonda multiparâmetro Horiba ®. Todos os valores obtidos foram comparados aos valores referências prescritas na legislação brasileira vigente. Os dados referentes aos valores dos parâmetros físico-químicos estão apresentados nas Tabela 2.

Tabela 2 – Dados obtidos com a sonda multiparâmetro Horiba ®, para os parâmetros de temperatura, pH, condutividade e oxigênio dissolvido, turbidez, sólidos totais dissolvidos (S.T.D.) e salinidade

Pontos	T (°C)			pH			Condutividade (mS/cm)			O_2 dissolvido (mg/L)			Turbidez (NTU)			S.T.D. (g/L)			Salinidade (ppt)		
	C1	C2	C3	C1	C2	C3	C1	C2	C3	C1	C2	C3	C1	C2	C3	C1	C2	C3	C1	C2	C3
CAP	21,1	20,1	21,0	7,7	7,7	7,2	5,0	0,1	0,1	6,0	**4,2**	**3,2**	0,1	5,6	17,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
SAS	21,7	24,0	23,9	7,7	7,4	**13,4**	0,3	0,2	1,7	**4,5**	7,4	5,2	1,6	7,7	72,7	0,4	0,1	**1,1**	**0,2**	0,0	**0,5**
SAE	21,8	21,2	23,4	9,1	**10,0**	8,3	0,2	0,3	0,3	**3,9**	**1,3**	**2,9**	**LD**	**LD**	**101,0**	0,1	0,2	0,2	0,0	0,1	0,1
RCM	21,6	21,1	22,5	8,9	7,3	7,6	0,1	0,0	0,1	**3,9**	5,1	**3,2**	0,3	6,4	15,5	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0
RCJ	21,5	21,0	23,5	**10,4**	7,1	7,6	0,2	0,1	0,1	**3,8**	5,3	**3,6**	4,0	7,7	18,6	0,1	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0
AAP	22,4	20,1	20,0	7,4	6,4	7,1	0,1	0,1	0,2	5,4	5,6	**3,7**	0,0	0,0	0,8	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0

VALORES DE REFERÊNCIA

	T (°C)	pH	Condutividade (mS/cm)	O_2 dissolvido (mg/l)	Turbidez (NTU)	S.T.D. (g/L)	Salinidade (ppt)
CONAMA 357/2005	-	**6 a 9**	**-**	**≥ 5**	**≤ 100**	**0,5**	**5%**
P.C. nº 5 Anexo XX/2017; GM/MS 888/2021	-	**6 a 9,5**	**-**	**-**	**<5**	**0,5**	-

Legenda: Os dados foram obtidos por meio da sonda multiparâmetro Horiba ®. T (ºC) – temperatura; STD (Sólidos Totais dissolvidos); **C1:** dados referentes a primeira coleta realizada em um período seco; **C2:** dados referentes a segunda coleta realizada em um período seco; **C3:** dados referentes a terceira coleta realizada em um período chuvoso. **CAP** – ponto de coleta no Ribeirão Claro, referente ao local de captação de água para tratamento pela ETA; **SAS** – ponto de coleta de amostra de água do Córrego Santo Antônio, cujas águas estão sem a influência do efluente da ETA; **SAE** – ponto de coleta de amostra de água do Córrego Santo Antônio, cujas águas já estão contaminadas com o efluente da ETA; **RCM** – ponto de amostragem de água no Ribeirão Claro, a montante do recebimento das águas do córrego Santo Antônio contaminadas com o efluente da ETA; 5. **RCJ** – ponto de amostragem de água no Ribeirão Claro, a jusante do recebimento das águas do Córrego Santo Antônio (ponto de mistura completa das águas do Córrego Santo Antônio com o Ribeirão Claro); 6. **AAP** – ponto de amostragem de água no cavalete do consumidor.

Na legislação vigente (CONAMA 357 de 2005, P.C Nº5 Anexo XX de 2017 e GM/MS 888 de 2021) não é descrito um valor de referência para o parâmetro temperatura. No entanto, é importante destacar que a temperatura pode influenciar processos físicos, químicos e biológicos dos ambientes aquáticos. Segundo Chapman (1996), o aumento na temperatura da água leva a redução da solubilidade de gases como O_2, CO_2, N_2 e CH_4, bem como, da atividade metabólica dos organismos, podendo aumentar o consumo de oxigênio, a decomposição da matéria orgânica e até estimular a proliferação de bactérias. Dessa forma, é de suma importância que seja incluída essa análise a avaliação de amostras de água de recursos hídricos impactados por descartes de efluentes em geral. Os resultados do presente estudo não demonstram um aumento significativo da temperatura nos pontos de coletas estudados, para as três coletas realizadas.

Com relação ao parâmetro de pH, existem padrões pré-definidos pela legislação brasileiras, portanto que devem ser seguidos. O pH (potencial hidrogeniônico) pode interferir diretamente sobre a fisiologia da biota local e indiretamente sobre as substâncias químicas presentes na água, tornando-as mais disponíveis ou precipitando-as (CETESB, 2010). Os resultados mostraram que nas diferentes coletas, a amostra de água destinada para o abastecimento público (AAP) estava dentro dos padrões vigentes de pH (pH neutro). Contudo, na primeira coleta, o RCJ apresentou um valor de pH de 10,4, considerado muito acima do estabelecido pela legislação vigente. Nesta mesma coleta, o SAE apresentou pH de 9,1, sendo considerado ligeiramente superior ao valor limite determinado pelo CONAMA 357/2005 (pH limite de 9). Para a segunda coleta, o SAE apresentou pH 10, valor este acima dos limites estabelecidos por ambas as legislações (BRASIL, 2005; CETESB, 2010). Com relação a terceira coleta, o SAS apresentou pH muito acima dos limites pré-estabelecidos (pH=13,4).

De acordo com Garcia et al. (2018), o pH elevado de uma amostra de água pode estar associado à presença de bicarbonatos e carbonatos, fato este que pode explicar os valores elevados registrados para a amostra do SAS. Os principais componentes que promovem a alcalinidade são: o ácido carbônico, bicarbonatos, carbonatos e hidróxidos (CETESB, 2020a). O SAS representa a água coletada no Córrego Santo Antônio, a montante do lançamento do efluente da ETA. Este ponto recebe diferentes tipos de resíduos advindos da galeria de água pluviais, como lixo, descarte irregular de resíduos urbanos ou industrial, mas ainda não está sob a influência do descarte do lodo da ETA. Já, os resultados observados para RCJ (primeira coleta) e SAE (primeira e segunda

coletas) podem estar relacionados aos resíduos descartados pela ETA, já que ambos os pontos estão localizados a jusante do lançamento do efluente da ETA. Além disso, os resultados observados para RCJ e SAE podem também podem estar relacionados aos períodos de coleta, pois estas ocorreram em uma época de baixa precipitação (Tabela 1). A quantidade de chuvas pode influenciar nas características físico e químicas dos rios. De acordo com Coelho et al. (2020), durante os períodos chuvosos pode haver uma diluição dos poluentes presentes nas águas, o que não é observado em períodos secos. Garcia et al. (2018) ainda destaca que os períodos prolongados de estiagem também podem influenciar no aumento do pH.

Os dados pluviométricos (Tabela 1) do mês de agosto de 2019 (primeira coleta) mostra um período de baixa precipitação (13,8 mm). A baixa pluviosidade registrada no período de coleta, pode ser caracterizada como um período de estiagem, visto que que os meses precedentes (maio, junho e julho) já apresentaram também baixa precipitação. Dessa forma, a baixa precipitação observada nestes meses, associada à poluição do local, podem ter influenciado os elevados pH do RCJ (10,4) e do SAE (9,1).

O mês da realização da segunda coleta (junho de 2020) teve um valor de precipitação alto (79,2 mm), em relação aos meses anteriores (abril e maio), porém a coleta das amostras foi realizada no início do mês, período que antecedeu a chuva registrada para o mês (Tabela 1). Dessa forma, as amostras de junho de 2020 também foram influenciadas pela estiagem, visto que em abril e maio foram registradas baixas precipitações. O alto pH registrado em SAE neste período (pH 10) pode estar associado à menor capacidade de depuração do rio, em decorrência da concentração de poluentes neste ponto de coleta tanto pela baixa precipitação, como pela sobrecarga dos resíduos do lodo do decantador ali presentes.

A terceira coleta (fevereiro de 2021) foi realizada em um período chuvoso (precipitação total de 198,9 mm). O SAE desta coleta, apesar de estar dentro dos parâmetros definidos pela legislação, apresentou um pH levemente básico (8,3), que pode estar relacionado à presença dos efluentes da ETA. O pH extremamente básico (13,4) do SAS pode ser explicado pelo fato do Córrego Santo Antônio se encontrar em uma região urbana, com forte influência de atividade antrópica. Grande parte das águas pluviais e dos resíduos do entorno desse córrego segue para uma galeria pluvial que chega neste córrego, tornando-o vulnerável à contaminação tanto de origem urbana como industrial.

A condutividade de um rio indica a quantidade de sais presentes na sua coluna d'água. Esse parâmetro é dependente tanto da concentração de íons como da temperatura da água. Valores elevados de condutividade mostram que o recurso hídrico apresenta uma alta quantidade de sais dissolvidos, o que é um indicativo de característica corrosiva para as suas águas (CETESB, 2020a). Desta forma, o lançamento de efluentes em um corpo d'água pode aumentar a quantidade de sólidos dissolvidos nas suas águas e, consequentemente, o valor de sua condutividade (CHAPMAN, 1996).

A legislação vigente não apresenta um valor de referência para condutividade, mas, se condutividade de um rio apresentar um valor acima de 100 µS/cm (0,1mS/cm), já é possível considerar que o rio está sendo impactado por atividades antrópicas (CETESB, 2020a; MANZANO et al., 2015). De acordo com os resultados obtidos neste estudo o SAS e SAE apresentaram valores de condutividade acima de 100 µS/cm, nas três coletas realizadas. Na terceira coleta, o SAS apresentou um valor superior de condutividade (1700 µS/cm ou 1,7 mS/cm), quando comparado com as duas primeiras coletas, para esse mesmo ponto. Esse resultado indica, assim como registrado para o parâmetro pH, que, apesar do SAS não receber influência dos descartes da ETA, este ponto apresenta problema de contaminação, provavelmente decorrente do despejo da galeria pluvial neste ponto do Córrego Santo Antônio. A condutividade aumentada deste ponto, sugere a existência de descartes clandestinos nesta galeria, o que está levando a um aumento na quantidade de sais dissolvidos nesse ponto de coleta. Já os valores altos de condutividade do SAE mostram que o lançamento do efluente da ETA pode estar interferindo na condutividade das águas do Córrego. Contudo, quando ocorre a mistura completa da água do Ribeirão Claro com o Córrego Santo Antônio, já há uma diminuição da condutividade, como pode ser observado pelos resultados do RCJ, com exceção da primeira coleta.

O CAP (água de captação da ETA) apresentou, na primeira coleta, o maior valor de condutividade registrado neste estudo (5000 µS/cm ou 5,0 mS/cm). Esse resultado pode ser devido a um efeito da seca prolongada, que aumentou a concentração de sais nas águas do Ribeirão Claro no ponto de captação da ETA. Já, para as demais coletas, o valor de condutividade deste ponto estava dentro do padrão apresentado pela CETESB (2020a). O AAP também apresentou um valor um pouco acima do sugerido pela CETESB (2020a) na terceira coleta, mas nas demais coletas a condutividade se manteve dentro do esperado.

O oxigênio dissolvido (OD) é um importante parâmetro de avaliação da qualidade da água de um recurso hídrico, visto que o oxigênio é extremamente importante para a manutenção da vida aquática. Um valor inferior a 3 mg/L de O_2 dissolvido na água já pode levar a uma diminuição significativa dos organismos bentônicos (LI et al., 2020). O oxigênio dissolvido nas águas naturais se dá pela diferença de pressão entre o ar e a água, devido a solubilidade do gás ir diminuindo à medida que a pressão vai caindo (LAMON, 2014).

De acordo com a Resolução do CONAMA 357 de 2005, os rios de Classe II, como o Ribeirão Claro, devem possuir valores de O.D. acima de 5 mg/L O_2. No entanto, como pode ser visto na tabela 1, os pontos CAP (segunda e terceira coletas) e RCM e RCJ (primeira e terceira coletas), relacionados a amostras de águas coletadas no Ribeirão Claro apresentaram valores de O.D. inferiores que 5 mg/L, o que mostra um desenquadramento deste rio como rio de Classe II. Também foram observados valores inferiores de O.D na primeira coleta no SAS e em todas as coletas realizadas no SAE. Os resultados observados para os pontos do Córrego Santo Antônio (SAS e SAE) podem estar relacionados com o lançamento de efluentes ricos em carga orgânica nesses pontos, já que a oxidação química e decomposição de matéria orgânica necessitam de altos níveis de oxigênio (OSIBANJO et al., 2011). Os resultados obtidos no SAE foram menores na segunda e terceira coletas (1,3 mg/L e 2,9 mg/L, respectivamente), sendo que em todas as coletas foram observados valores inferiores a 5 mg/L, estando em desconformidade com a Resolução do CONAMA 357, resultados esses que apontam que o SAE pode estar sofrendo influência do descarte do efluente da ETA, já que o efluente é lançado diretamente onde o curso d'água se apresenta mais lêntico. O baixo valor de O.D. registrado para SAS pode estar relacionado com o descarte da galeria pluvial neste pondo do Córrego Santo Antônio, conforme já citado anteriormente, que deve conter, além de água de chuva, descartes clandestinos de efluentes industriais e urbanos.

Outro parâmetro importante a ser considerado na avaliação da qualidade de recurso hídrico é a turbidez. A turbidez, que representa a distribuição das partículas suspensas na coluna d'água, pode variar por influência de chuvas intensas e/ou por lançamento de efluentes domésticos e industriais nos corpos d'água (CHAPMAN, 1996). De acordo com a Resolução 357 do CONAMA (2005), as águas de rios de Classe II devem apresentar uma turbidez menor que 100 UTN (unidade de turbidez nefelométrica). Os resultados do presente estudo mostraram que apenas o SAE apresentou, para todas as amostras de

águas coletadas, valores acima do permitido pela legislação vigente, sendo que nas duas primeiras coletas as amostras apresentaram turbidez acima do limite de detecção pela sonda multiparâmetro utilizada. Como as coletas das amostras de águas foram realizadas logo após o descarte da água da lavagem dos decantadores da ETA, pode-se inferir que os resíduos presentes nesse efluente impactam diretamente este ponto de coleta. Esses resultados confirmam os impactos registrados nos valores de O.D., reforçando a afirmação que o efluente da ETA pode ser rico em matéria orgânica.

Com relação a água destinada ao abastecimento público, a Portaria de Consolidação nº 5 de 2017, em seu Anexo XX, e a Portaria GM/MS nº 888 de 2021, determinam que o valor de turbidez esteja abaixo de 5 UTN. De acordo com os resultados apresentados na tabela 2, o AAP apresentou valores abaixo de 5 UTN, confirmando assim que a água de abastecimento público está dentro dos limites estabelecidos.

Os sólidos totais dissolvidos (S.T.D.) caracterizam-se como um parâmetro de avaliação de qualidade da água, que mede a concentração de sais e minerais presentes nos corpos hídricos, seus valores são extremamente importantes para as decisões dos processos operacionais de uma ETA, pois podem, até mesmo, descaracterizar o corpo d'água para ser utilizado como fonte de abastecimento (REALI; PAZ; DANIEL, 2013). A Resolução do CONAMA 357 de 2005, que determina os padrões de qualidade dos rios, de acordo com sua Classe (1 a 4), determina que rios de Classe II devem apresentar valores de S.T.D. inferiores a 500 mg/L (0,5 g/L). De acordo com os resultados obtidos no presente estudo para STD, todos os pontos avaliados tiveram resultados inferiores a 0,5 g/L, exceto o SAS (terceira coleta), que apresentou um valor 2 vezes maior (1,1 g/L) que o recomendado pela legislação.

Com relação a salinidade, a Resolução do CONAMA 357 (2005) determina que os rios de Classe II devem ter salinidade inferior a 0,5%. Esse parâmetro visa medir a concentração de sais dissolvidos nas águas dos recursos hídricos. Os resultados desse estudo mostraram que, na primeira e terceira coleta, o SAS teve valores acima de 0,5% de salinidade (0,2 e 0,5 ppt, respectivamente). Estes resultados podem estar relacionados a influência antrópica do local, pois, neste ponto, o Córrego Santo Antônio recebe um aporte de resíduos presentes na galeria pluvial do entorno. O SAE também apresentou valores um pouco acima do estabelecido pela legislação (0,1 ppt), provavelmente devido à contaminação já presente no ponto a montante do mesmo rio (SAS).

Outra forma de obter valores de salinidade é pela secagem de amostra e pesagem da matéria seca; por análise química ou por métodos indiretos de medição (condutividade, densidade, velocidade do som ou índice de refração) (APHA; AWWA; WEF, 2017). Como descrito, uma maneira indireta de obter um resultado de salinidade é pela condutividade. Como pode ser observado na Tabela 1, a condutividade nos pontos SAS e SAE apresentaram valores acima de 100 µS/cm e, coincidentemente, também tiveram seus valores de salinidade mais altos, corroborando assim às citações de APHA, AWWA e WEF (2017).

Reis et al. (2007) avaliaram os parâmetros de pH, oxigênio dissolvido, turbidez e sólidos totais de amostras de água coletadas a montante e a jusante do descarte do efluente de uma ETA da cidade de Registro (SP). Contudo, naquele estudo, os autores não observaram nenhuma influência dos resíduos da ETA na qualidade da água do rio receptor, pois os valores dos parâmetros avaliados a jusante do descarte estavam de acordo com os prescritos na Resolução CONAMA (2005). Os autores identificaram que o período chuvoso influenciou na dispersão dos resíduos do lodo gerado na ETA.

Durante as coletas do período chuvoso, realizados no presente estudo, pode ser observado que a pluviosidade contribuiu para uma maior dispersão do lodo do decantador da ETA no ponto SAE e, consequentemente no RCJ, como também observado nos estudos de Reis et al. (2007). Foi observado nas coletas do período de seca, realizadas no presente estudo, que se formavam bancos de resíduos do lodo do decantador no curso do Córrego Santo Antônio, pós recebimento do efluente, em decorrência do assoreamento do lodo recebido. Já no período de chuvas, com a vazão mais elevada, estes bancos não ficaram tão evidentes, mostrando que os resíduos do lodo foram mais facilmente dispersados.

Assis (2014) avaliou os impactos dos resíduos de uma ETA no Bairro Industrial da cidade de Juiz de Fora (MG) sobre o seu corpo d’água receptor (Ribeirão Espírito Santo). No estudo, foi observado que o lodo advindo do decantador alterou visivelmente o corpo d’água receptor, pois o rio recebia em um período de 60 dias, cerca de 37 toneladas de sólidos. Frente aos estudos citados, que são corroborados pelas avaliações realizadas neste estudo de impactos dos resíduos da ETA de Rio Claro sobre os seus corpos hídricos receptores, fica claro que o tratamento do lodo gerado em ETA, antes do mesmo ser

descartado no ambiente, é de fundamental importância para a segurança e garantia da qualidade da água dos corpos hídricos receptores.

Na Tabela 3 estão apresentados os resultados dos parâmetros fluoreto, fosfato, nitrogênio total, DBO e DQO, para as três amostragens realizadas.

Tabela 3 – Resultados de fluoreto, fosfato, nitrogênio total, DBO e DQO

Pontos	Fluoreto (mg/L)			Fosfato (mg/L)			Nitrogênio Total (mg/L)			DBO (mg/L O_2)			DQO (mg/L O_2)		
	C1	C2	C3	C1	C2	C3	C1	C2	C3	C1	C2	C3	C1	C2	C3
CAP	0,60	0,60	0,38	0,07	0,06	0,08	0,41	0,09	0,83	**6,10**	**5,80**	**7,80**	17,32	18,5	14,4
SAS	0,35	0,29	0,42	**0,12**	**0,90**	**0,98**	**7,84**	**7,23**	**12,00**	**11,90**	**9,90**	**44,40**	32,64	30,05	71,52
SAE	0,19	0,20	0,39	**0,14**	**0,12**	**1,20**	**5,85**	**2,91**	**10,89**	**7,40**	**8,95**	**8,30**	11,96	15,25	10,56
RCM	0,09	0,09	0,34	0,05	0,07	0,09	0,16	0,31	1,41	**5,60**	**6,60**	**9,30**	22,89	23,5	12,96
RCJ	0,21	0,20	0,21	**0,12**	**0,13**	0,10	0,37	0,37	**4,83**	**9,90**	**7,90**	**10,70**	16,56	17,25	18,72
AAP	**0,59**	0,60	0,60	0,07	0,05	<0,02	0,05	0,02	Ausência	2,01	1,04	7,20	6,7	7,05	12,96

VALORES DE REFERÊNCIA

	Fluoreto (mg/L)	Fosfato (mg/L)	Nitrogênio Total	DBO (mg/L O_2)	DQO (mg/L O_2)
CONAMA 357/2005	**1,4 mg/L**	**0,1 mg/L**	**3,7mg/L N, para pH ≤ 7,5; 2,0 mg/L N, para 7,5 < pH ≤ 8,0; 1,0 mg/L N, para 8,0 < pH ≤ 8,5; 0,5 mg/L N, para pH > 8,5**	**5,0 mg/L**	**-**
P.C. nº 5 Anexo XX/2017 GM/MS 888/2021	**0,6 a 0,8 mg/L**	**-**	**-**	**-**	-

Legenda: C1: dados referentes a primeira coleta realizada em um período seco; **C2:** dados referentes a segunda coleta realizada em um período seco; **C3:** dados referentes a terceira coleta realizada em um período chuvoso. **CAP** – ponto de coleta no Ribeirão Claro, referente ao local de captação de água para tratamento pela ETA; **SAS** – ponto de coleta de amostra de água do Córrego Santo Antônio, cujas águas estão sem a influência do efluente da ETA; **SAE** – ponto de coleta de amostra de água do Córrego Santo Antônio, cujas águas já estão contaminadas com o efluente da ETA; **RCM** – ponto de amostragem de água no Ribeirão Claro, a montante do recebimento das águas do córrego Santo Antônio contaminadas com o efluente da ETA; 5. **RCJ** – ponto de amostragem de água no Ribeirão Claro, a jusante do recebimento das águas do Córrego Santo Antônio (ponto de mistura completa das águas do Córrego Santo Antônio com o Ribeirão Claro); 6. **AAP** – ponto de amostragem de água no cavalete do consumidor.

O flúor é um composto extremamente instável e, por isso, esse composto é encontrado na sua forma complexada, ou seja, como fluoreto (JOHNSTON; STROBEL, 2020). Quanto aos resultados de fluoreto, todas as amostras do Córrego Santo Antônio, Ribeirão Claro e a água de captação, nas três coletas realizadas, ficaram dentro dos valores estabelecidos pela legislação (Resolução do CONAMA 357) (BRASIL, 2005), ou seja, abaixo de 1,4 mg/L. A água de abastecimento público ficou dentro do estabelecido pela legislação (entre 0,6 a 0,8 mg/L), exceto na primeira coleta, que ficou levemente abaixo do exigido pela legislação (BRASIL, 2017), portanto a AAP, da primeira coleta, não atende a portaria de potabilidade da água.

Outro indicativo de contaminação dos corpos hídricos é a presença de fósforo em águas superficiais. As principais fontes de contaminação por fósforo são: descarte de esgoto sanitário nos corpos hídricos, matéria orgânica fecal e/ou detergentes utilizados nas residências. Os efluentes industriais, pesticidas, produtos químicos, conservantes, resíduos de abatedouros, frigoríficos e laticínios também podem se caracterizar como fontes adicionais de fósforo. O fósforo pode ser encontrado na forma de fosfato orgânico (CETESB, 2020a). Os fatores que podem influenciar os níveis de fosfato nos corpos d'água são a localização e características dos recursos hídricos, a densidade populacional do entorno dos corpos hídricos, presença de atividade agrícola ou industriais nas proximidades do corpo d'água, características topográficas, clima e atividade biológica no solo (FADIRAN; DLAMINI; MAVUSO, 2008).

Em relação aos resultados dos índices de fosfato nas amostras coletadas, foi observado que alguns pontos (SAE e RCJ) apresentaram valores um pouco acima do recomendando (0,1 mg/L) pela CONAMA 357, na primeira e segunda coletas realizadas. Já o ponto SAS, que apresentou um leve aumento da concentração de fosfato na primeira coleta, apresentou, na segunda e terceira coleta, uma maior presença de fosfato nas suas amostras. Tal fato pode estar relacionado com a influência dos resíduos urbanos, principalmente dos detergentes domésticos lançados na galeria de água pluvial, que chegam ao Córrego Santo Antônio, promovendo essa alteração do fosfato neste ponto de coleta, pois esse ponto de coleta não tem interferência do efluente da ETA. Outra possibilidade seria o lançamento de efluentes industriais ou de abatedouro de frangos presentes nas proximidades com o córrego. Essa contaminação pontual citada, pode ser sugerida, pois foram observadas outras alterações para as águas desse ponto (pH, condutividade, turbidez, sólidos totais dissolvidos e salinidade observados na terceira

coleta), conforme pode ser observado nos padrões físico-químicos apresentados na Tabela 1. O Córrego Santo Antônio, no ponto SAE, também apresentou valor para fosfato acima do permitido pela legislação CONAMA 357 (BRASIL, 2005). Tal resultado pode estar relacionado com resíduos da galeria de água pluvial que chegam no SAS e se acumulam nos sedimentos provenientes do lodo da lavagem dos decantadores e filtros da ETA no SAE.

Fadiran, Dlamini e Mavuso (2008) avaliaram os níveis de fosfato de corpos hídricos superficiais, subterrâneos e de amostras de água da torneira das regiões de Manzini e Lubombo (Suazilândia/África). Os autores constataram que 83% das amostras de água superficiais e 93% das amostras subterrâneas apresentaram valores acima de 0,10 mg/L de fosfato, mas não observaram alterações para as águas de abastecimento público. Pelos resultados registrados, os autores inferiram que os recursos hídricos estudados estavam passando por processos de eutrofização. O processo de eutrofização pode ocorrer naturalmente, mas também pode ser em decorrência do excesso de nutrientes (fósforo e nitrogênio), que chegam nos recursos hídricos derivados de ações humanas. Esses nutrientes promovem a proliferação exacerbada de algas ou cianobactérias, que esgotam os níveis de O_2 dissolvido e/ou produzem substâncias tóxicas que, inviabilizando a vida de outros organismos endêmicos do local (BHATERIA; JAIN, 2016).

Outro parâmetro extremamente importante para a avaliação de impactos nos cursos d’água é o nitrogênio total. Dependendo da concentração em que os compostos nitrogenados estão presentes no ambiente aquático, pode ser um indicativo de lançamento de esgotos sanitários/domésticos ou de efluentes industriais (CETESB, 2020a). Os pontos SAS e SAE (córrego Santo Antônio) apresentaram uma maior presença de nitrogênio total em todas coletas, sendo que a última delas apresentou valores ainda mais elevados que as demais. Por estes dados, é possível inferir que o córrego está recebendo um aporte de compostos nitrogenados, derivados de lançamentos de resíduos domésticos e/ou industriais na galeria pluvial, que estão sendo repassados do SAS para o SAE. Na última coleta, foi também registrado um aumento da presença de compostos nitrogenados no RCJ, cujos índices excederam os limites propostos pela Resolução CONAMA 357 (BRASIL, 2005).

A DBO (demanda bioquímica de oxigênio) corresponde a quantidade de oxigênio necessária para oxidar a matéria orgânica, por processos de decomposição microbiana

aeróbia (CETESB, 2020a). A DBO é uma maneira indireta de quantificar a matéria orgânica, portanto, nos sistemas aquáticos, valores elevados de DBO podem indicar impactos derivados da presença de efluentes industriais ou domésticos na água (OLIVEIRA; SANTOS; BOEIRA, 2012). Águas consideradas limpas apresentam uma DBO menor que 2 mg/L O_2, enquanto que águas que recebem por efluentes podem apresentar valores acima de 10 mg/L O_2 (ROBERTO, 2014). No presente estudo, todos os pontos de coleta realizadas nos corpos d'água (CAP, SAS, SAE, RCM e RCJ) apresentaram valores acima dos estabelecidos pela Resolução CONAMA 357 (BRASIL, 2005) (5,0 mg/LO_2). As amostras do SAS, apresentaram, na primeira e segunda coletas, altos valores de DBO (próximos a 10 mg/L O_2) e na terceira extremamente alto (44,40 mg/L O_2), reforçando que neste local está havendo um lançamento de resíduos domésticos e/ou industriais detectado nesta coleta.

Os valores elevados de DBO indicam que está havendo uma maior atividade de microrganismos que, consequentemente, leva a um aumento do consumo de oxigênio e diminuição do OD na água (Tabela 1). Esses resultados indicam ainda que esses impactos podem estar afetando, diretamente, a sobrevivência dos organismos aquáticos do local. A informação de que o aumento de DBO, registrado para todas as amostras dos recursos hídricos estudados, promoveu a diminuição do OD, pode ser comprovada pela alta carga microbiana (coliformes totais, *Escherichia coli*, bactérias heterotróficas e fungos) observada nas amostras de todos os pontos analisados (Tabela 3). Pela comparação entre a Tabela 2 e a Tabela 3, é possível associar a alta presença de microrganismos aos altos valores de DBO, pois o ponto que exibiu os maiores valores de DBO (SAS) foi também o que apresentou a maior presença de microrganismos.

A DQO (demanda química de oxigênio) consiste na quantidade de oxigênio necessário para a oxidação da matéria orgânica de uma amostra, utilizando um agente químico fortemente oxidante, como o dicromato de potássio. Normalmente os valores de DQO são maiores que DBO. Este parâmetro é utilizado para a detecção da suscetibilidade de compostos orgânicos ou inorgânicos presentes nos corpos hídricos oxidarem a matéria orgânica (CETESB, 2020a; CHAPMAN, 1996). Não existe para DQO um valor de referência estabelecido pela Resolução do CONAMA 357 (BRASIL, 2005). As águas superficiais consideradas limpas apresentam um valor de DQO de até 20 mg/LO_2, enquanto que valores superiores (até 200 mg/LO_2) são indicativos de que o corpo hídrico está recebendo aporte de efluentes em seu curso. A DQO dos corpos hídricos que

recebem, especificamente efluentes industriais, pode variar de 100 a 60.000 mg/LO_2 (CHAPMAN, 1996; ROBERTO, 2014). Os resultados de DQO, registrados para as amostras do ponto SAS, estão acima de 20 mg/L O_2 (32,64 mg/L O_2, para a primeira campanha; 30,05 mg/L O_2, para segunda e 72,52 mg/L O_2, para a terceira). Portanto, neste local, a água pode ser considerada com influência de impacto antrópico, e pode alterar, negativamente, outros parâmetros do Ribeirão Claro. Na terceira coleta, o SAS foi o ponto que apresentou um maior valor de DQO. Por esses dados pode-se inferir que há um indício da possibilidade de estar havendo lançamentos de resíduos industriais na galeria de água pluvial que chega no Córrego Santo Antônio. Também foi observado que esse impacto vai diminuindo ao longo do curso do rio, já que não foram observados valores elevados de DQO no SAE. O Ribeirão Claro no ponto RCM apresentou nas duas primeiras coletas valores um pouco elevados de DQO (22,89 e 23,50 mg/L O_2, respectivamente) (Tabela 2). Uma das explicações para esse leve aumento na DQO pode ser pelo período de coleta das amostras que se deu na estação seca.

Os microrganismos são muito utilizados no monitoramento ambiental, principalmente as bactérias, por serem excelentes biomarcadores de poluição de águas superficiais. O grupo de coliformes totais são bons indicadores da poluição de origem fecal e a presença de microrganismo patogênicos relacionados ao lançamento de efluentes domésticos, como esgoto, *in natura.* A detecção de microrganismos, bem como de agentes genotóxicos e/ou mutagênicos, são ferramentas importantes para a melhor gestão das bacias hidrográficas (PÁLL et al., 2013). Na Tabela 4 estão apresentados os resultados das variáveis microbiológicas utilizados para a avaliação do impacto ambiental do efluente da ETA nos corpos hídricos receptores córrego Santo Antônio e Ribeirão Claro.

Tabela 4 – Resultados de coliformes totais, *Escherichia coli*, bactérias heterotróficas e fungos, para as três amostragens realizadas

Pontos	Coliformes Totais			*Escherichia coli*			Bactérias Heterotróficas			Fungos		
	C1	C2	C3	C1	C2	C3	C1	C2	C3	C1	C2	C3
CAP	**7.300**	**4500**	**5.200**	Ausência	500	100	31.000	15.000	28.000	150	600	150
SAS	**95.000**	**21.000**	**95.200**	**50.000**	**40.000**	**5.100**	99.200	1.905.000	120.000	20.800	3.510	20.800
SAE	**21.500**	**9.000**	**21.500**	**7.300**	**3.000**	**7.300**	57.000	2.502.000	57.000	1.100	3.000	1.100
RCM	**12.000**	**27.000**	**12.000**	**1.100**	700	**1.100**	41.000	290.000	41.000	240	700	240
RCJ	**18.600**	**9.300**	**18.600**	**2.300**	950	**2.300**	36.200	389.000	36.200	200	100	400
AAP	Ausência	**<1**	Ausência	Ausência	**<1**	Ausência	20	<1	Ausência	Ausência	<1	Ausência

VALORES DE REFERÊNCIA

	Coliformes Totais	*Escherichia coli*	Bactérias Heterotróficas	Fungos
CONAMA 357/2005	**1000 UFC/100 mL**	**1000 UFC/100 mL**	**-**	**-**
P.C. nº 5 Anexo XX/2017 GM/MS 888/2021	**Ausência em 100 mL**	**Ausência em 100 mL**	**500 UFC/100 mL**	**-**

Legenda: C1: dados referentes a primeira coleta realizada em um período seco; **C2:** dados referentes a segunda coleta realizada em um período seco; **C3:** dados referentes a terceira coleta realizada em um período chuvoso. **CAP** – ponto de coleta no Ribeirão Claro, referente ao local de captação de água para tratamento pela ETA; **SAS** – ponto de coleta de amostra de água do Córrego Santo Antônio, cujas águas estão sem a influência do efluente da ETA; **SAE** – ponto de coleta de amostra de água do Córrego Santo Antônio, cujas águas já estão contaminadas com o efluente da ETA; **RCM** – ponto de amostragem de água no Ribeirão Claro, a montante do recebimento das águas do córrego Santo Antônio contaminadas com o efluente da ETA; 5. **RCJ** – ponto de amostragem de água no Ribeirão Claro, a jusante do recebimento das águas do Córrego Santo Antônio (ponto de mistura completa das águas do Córrego Santo Antônio com o Ribeirão Claro); 6. **AAP** – ponto de amostragem de água no cavalete do consumidor.

Observando os resultados da segunda coleta o ponto AAP apresentou coliformes totais (<1), indicando a não eficiência do tratamento realizado para a ETA. Esses resultados comprovam que a água distribuída pela referida ETA não atende à portaria de potabilidade do Ministério da Saúde (BRASIL, 2021). Os demais pontos (CAP, SAS, SAE, RCM e RCJ) apresentaram valores muito acima de 1000 UFC/100 mL, estabelecidos para rios de Classe II, conforme disposto pela Resolução 357 do CONAMA (BRASIL, 2005), sendo que os valores mais elevados foram registrados no SAS (95.000, 21.000, 95.200 UFC/100 mL, respectivamente para a primeira, segunda e terceira coletas).

O resultado obtido com o SAS pode ser relacionado com os elevados valores obtidos para o fósforo e nitrogênio total (Tabela 3), evidenciando a influência antrópica, nas proximidades do ponto citado, e que pode estar chegando resíduos domésticos e/ou industriais na galeria de água pluvial, já que, neste ponto não há influência dos efluentes da ETA. Com relação aos pontos RCM e RCJ, esses pontos também apresentaram valores acima de 1000 UFC/100 mL, estabelecida pela CONAMA 357 (BRASIL, 2015). Estes pontos estão localizados na Floresta Estadual Edmundo Navarro de Andrade (FEENA), uma unidade de conservação, onde os animais circulam livremente, podendo haver o aporte de suas fezes no Ribeirão; influência de atividade humana em seu entorno (sede administrativa e atividade industrial) e contaminação fecal derivada da área periurbana, já que há a criação de animais (bovinos e equinos) no local.

A principal bactéria do subgrupo dos coliformes termotolerantes é a *Escherichia coli*, sendo esta um organismo exclusivamente de origem fecal. Devido a sua origem, essa bactéria é considerada um indicador adequado de contaminação fecal em águas doces (CETESB, 2020b). Com relação aos resultados de *E. coli* para a AAP, somente foi observada presença desse microrganismo (<1) na segunda coleta realizada, o que demonstrou que água distribuída naquele momento, não atendia a portaria de potabilidade da água. Ao observar os resultados obtidos para os rios de Classe II, pode-se observar que a amostra de captação se encontrou dentro dos padrões estabelecidos pela legislação, já que apresentou valores menores que 1000 UFC/100 mL de *E. coli*. Em relação aos valores de *E. coli,* para o córrego Santo Antônio, foi observado, principalmente no SAS, valores muito acima de 1000 UFC/100 mL, salientando que, neste local, estava havendo forte influência da área urbana. No ponto SAE, foi observado uma menor presença de *E. coli,* quando comparado ao SAS. As amostras de água dos pontos RCM e RCJ (Ribeirão Claro) não atenderam os padrões estabelecidos pela legislação, para os

rios de Classe II, que permitem até 1000 UFC/100 mL de *E. coli*. Assim como apontado pelos dados de coliformes totais, os resultados de *E. coli* também sugerem haver interferência de atividade urbana nos pontos de coletas do Ribeirão Claro.

A Resolução 357 do CONAMA (BRASIL, 2005) não estabelece valores de referência para bactérias heterotróficas, mas podem ser utilizados como indicadores complementares da qualidade da água. Quanto maior a presença de bactérias heterotróficas em um recurso hídrico, maior é a indicação de presença de matéria orgânica na água, podendo essa ser de origem fecal ou não (ARAUJO et al., 2015). Pelos resultados das análises de bactérias heterotróficas, realizadas com as amostras de água coletadas (Tabela 4), pode observar que os pontos localizados no córrego Santo Antônio (SAS e SAE) foram os que apresentaram as maiores incidências destes microrganismos. Por esses dados, é possível associar à maior presença desses microrganismos com a alta atividade microbiológica, o maior consumo de oxigênio, a diminuição do OD, e os valores elevados de DBO nestes pontos. Tal fato também aconteceu nos pontos localizados no Ribeirão Claro (RCM e RCJ).

Os fungos também podem ser utilizados como bioindicadores e/ou biomarcadores da qualidade dos ambientes aquáticos, já que há uma relação entre a variação da comunidade fúngica e as atividades antrópicas no meio. Contudo o uso desses microrganismos como indicador de impacto antropogênico ainda apresenta algumas restrições. Atividades antrópicas relacionadas com a descarga de águas residuais ou o uso de pesticidas são ações que impactam negativamente a comunidade fúngica do meio, pela diminuição na sua diversidade (BAI et al., 2018). Os fungos no ambiente aquático são extremamente importantes, já que estes organismos atuam como decompositores da matéria orgânica, podendo decompor compostos fenólicos, lignina, celulose, hemicelulose, substâncias húmicas e até mesmo xenobiontes (CUDOWSKI; PIETRYCZUK; HAUSCHILD, 2015). A Resolução CONAMA 357 (BRASIL, 2005) não estabelece valores de referência para fungos. Ao observar os resultados obtidos nesta avaliação (Tabela 4), o ponto SAS apresentou uma maior presença destes microrganismos, quando comparado com os demais pontos, indicando que naquele ponto pode estar havendo uma maior presença de matéria orgânica. Em relação ao ponto SAE, também pode estar havendo uma maior presença de matéria orgânica, pois os resíduos da ETA formam bolsões e os resíduos orgânicos podem se acumular naquele ponto,

explicando assim a maior presença de fungos, em comparação com os demais pontos estudados.

3.2 Avaliação da toxicidade do lodo da ETA estudada, por bioindicadores vegetais

Muitas plantas superiores são utilizadas em estudo que visam o monitoramento ambiental, pois são sensíveis ao estresse ambiental, podendo, por esta razão, serem utilizados em avaliações de amostras de água e sedimento (KOHATSU et al., 2018). Alguns bioindicadores vegetais podem ainda detectar efeitos de mutágenos em diferentes ambientes, bem como avaliar diferentes alterações genéticas e anatômicas em diferentes órgãos ou estruturas (e.g. raízes, folhas e pólen).

3.2.1 Avaliação do potencial fitotóxico, pelo bioindicador *Lactuca sativa*

O organismo teste *L. sativa* é uma espécie amplamente utilizada como modelo para ensaios de fitotoxicidade, sendo recomendado para esse tipo de avaliação. Para a avaliação do potencial fitotóxico, podem ser utilizados os testes de germinação e de alongamento das raízes (LYU et al., 2018). Neste estudo foi aplicado o teste de fitotoxicidade pelo teste de germinação

Na Tabela 5, estão apresentados os resultados referentes aos índices de germinação das sementes de *L. sativa*, expostas às diversas amostras de águas coletadas. Os dados mostram que apenas o RCM (primeira coleta) apresentou diminuição estatisticamente significativa na germinação (71,67%). Sobrero e Ronco (2004) afirmam que a morte do embrião das sementes, decorrente da exposição das mesmas a um agente químico ou por uma amostra ambiental, é indicativo da letalidade do agente avaliado. Dessa forma, apesar das amostras do RCM ter levado a uma diminuição na germinação das sementes de *L. sativa*, esse ponto não inibiu, completamente, a germinação das mesmas, não podendo ser considerado letal para o bioindicador. Os demais pontos apresentaram germinação acima de 80%, com exceção também do RCJ em C1 (78,33%). Portanto, as amostras não apresentaram potencial fitotóxico, pela avaliação realizada pelo teste de fitoxicidade de *L. sativa*.

Kohatsu et al. (2018), avaliaram a fitotoxicidade de águas superficiais da Região Metropolitana de São Paulo, utilizando para esta análise sementes de mostarda (*Sinapis alba*). Os autores fizeram uma correlação entre a germinação, a condutividade e os sólidos totais dissolvidos das amostras. As coletas das amostras do estudo citado foram realizadas no Córrego Ribeirão Pires e na região preservada do Braço Rio Grande (Represa Billings), local este considerado como referência. Os resultados de germinação mostraram que a amostra coletada no local de referência não foi fitotóxico, resultados esses que os autores interpretaram ser devido à preservação e proteção da área ao entorno da represa. Já os resultados da amostra do Córrego Ribeirão Pires exibiram fitotoxicidade moderada, que os autores relacionaram ao lançamento de esgoto doméstico sem tratamento prévio próximo ao local amostrado do córrego. Os autores ainda relacionaram os resultados de condutividade e a presença de carbonato, bicarbonato, cloreto, sulfato, fosfato, nitrato, cálcio, magnésio, sódio e outros íons (sólidos totais dissolvidos) com o descarte de esgoto *in natura*, que inibiram o crescimento radicular do bioindicador. No entanto, o presente estudo não avaliou o crescimento radicular de *L. sativa*, não sendo possível estabelecer relações entre o alongamento da radícula e os parâmetros de condutividade e sólidos totais.

Tabela 5 – Índice (em porcentagem) de germinação de amostras de águas coletadas em rios que sofrem influência da atividade da ETA, bem como da água destinada ao abastecimento público da cidade de Rio Claro-SP, por meio de ensaios realizados com o bioindicador de *Lactuca sativa* (alface)

Tratamento	Germinação *Lactuca sativa*		
	C1	C2	C3
CN	90% ± 0%	100% ± 0%	93,33% ± 2,89%
CP	0% ± 0% *	0% ± 0% *	0% ± 0% *
CAP	83,33% ± 7,64%	100% ± 0%	98,33% ± 2,89%
SAS	81,67% ± 11,55%	91,67% ± 7,64%	95,00% ± 5,00%
SAE	80,00% ± 8,66%	95,00% ± 5,00%	86,67% ± 2,89%
RCM	71,67% ± 5,77% *	96,67% ± 2,89%	96,67% ± 5,77%
RCJ	78,33% ± 2,89%	91,67% ± 2,89%	96,67% ± 5,77%
AAP	83,33% ± 2,89%	98,33% ± 2,89%	98,33% ± 2,89%

Legenda: **CN:** Controle Negativo; **CP:** Controle Positivo (sulfato de zinco heptahidratado). **CAP** – ponto de coleta no Ribeirão Claro, referente ao local de captação de água para tratamento pela ETA; **SAS** – ponto de coleta de amostra de água do Córrego Santo Antônio, cujas águas estão sem a influência do efluente da ETA; **SAE** – ponto de coleta de amostra de água do Córrego Santo Antônio, cujas águas já estão contaminadas com o efluente da ETA; **RCM** – ponto de amostragem de água no Ribeirão Claro, a montante do recebimento das águas do córrego Santo Antônio contaminadas com o efluente da ETA; 5. **RCJ** – ponto de amostragem de água no Ribeirão Claro, a jusante do recebimento das águas do Córrego Santo Antônio (ponto de mistura completa das águas do Córrego Santo Antônio com o Ribeirão Claro); 6. **AAP** – ponto de amostragem de água no cavalete do consumidor. Os resultados com * foram estatisticamente significativos ($p < 0,05$). **C1:** dados referentes a primeira coleta realizada em um período seco; **C2:** dados referentes a segunda coleta realizada em um período seco; **C3:** dados referentes a terceira coleta realizada em um período chuvoso.

3.2.1 Avaliação do potencial citogenotóxicos e mutagênico, pelo bioindicador *Allium cepa*

A espécie *Allium cepa* é uma planta muito utilizada para monitoramento de áreas impactadas. A adequabilidade deste bioindicador para a avaliação de citogenotoxicidade de poluentes ambientais reside nas suas características citogenéticas, como cromossomos grandes e em número reduzido, que favorece as observações das alterações no ciclo celular (mitose) e a presença de aberrações cromossômicas, durante as fases de divisão da mitose (LEME; MARIN-MORALES, 2009). Na Tabela 6 estão

apresentados os resultados obtidos com o organismo teste *A. cepa*, referente ao potencial citotóxico (Índice Mitótico), genotóxico (Índice de Genotoxicidade) e mutagênico (Índice de Mutagenicidade).

Tabela 6 – Avaliação da citotoxicidade (Índice Mitótico), genotoxicidade (Índice de Genotoxicidade) e potencial mutagênico (Índice de Mutagenicidade) de amostras de águas coletadas em corpos hídricos que sofrem influência da atividade da ETA, bem como da água destinada ao abastecimento público da cidade de Rio Claro-SP, por meio de ensaios com o bioindicador *Allium cepa*

Pontos	Índice Mitótico			Índice de Genotoxicidade			Índice de Mutagenicidade		
	C1	C2	C3	C1	C2	C3	C1	C2	C3
CN	15,44 ± 3,15	22,75 ± 4,99	21,63 ± 3,50	0,20 ± 0,19	0,55 ± 0,31	0,40 ± 0,34	0,09 ± 0,09	0,15 ± 0,20	0,43 ± 0,38
CP	18,13 ± 3,44	20,70 ± 4,27	18,47 ± 3,57	1,11 ± 1,01 *	1,49 ± 1,02	1,16 ± 0,46 *	10,22 ± 4,59 *	2,32 ± 1,22 *	1,68 ± 1,14 *
CAP	16,35 ± 4,06	19,61 ± 2,93	20,09 ± 4,48	0,30 ± 0,18	0,22 ± 0,24	0,45 ± 0,32	0,05 ± 0,09	0,25 ± 0,30	0,38 ± 0,35
SAS	13,19 ± 4,62	18,95 ± 3,67	17,59 ± 3,48	0,34 ± 0,35	0,75 ± 0,60	1,20 ± 0,29 *	0,08 ± 0,13	0,48 ± 0,45	0,49 ± 0,49
SAE	14,09 ± 5,47	20,71 ± 3,62	19,54 ± 4,41	0,32 ± 0,38	0,79 ± 0,50	1,65 ± 0,85 *	0,14 ± 0,29	0,55 ± 0,48	1,11 ± 1,20
RCM	15,69 ± 4,21	16,28 ± 1,83 *	17,68 ± 3,79	0,41 ± 0,37	0,63 ± 0,48	1,49 ± 0,68 *	0,21 ± 0,28	0,38 ± 0,26	1,00 ± 0,69
RCJ	14,27 ± 2,03	15,19 ± 2,91 *	20,53 ± 3,52	0,78 ± 0,82	0,67 ± 0,42	1,30 ± 0,60 *	0,08 ± 0,16	0,32 ± 0,27	1,35 ± 1,25
AAP	17,49 ± 5,75	18,17 ± 3,78 *	20,53 ± 3,52	1,01 ± 0,75 *	0,81 ± 0,75	1,28 ± 0,59 *	0,05 ± 0,10	0,74 ± 0,65 *	1,22 ± 0,78

Legenda: CN: Controle Negativo; **CP:** Controle Positivo (MMS). **CAP** – ponto de coleta no Ribeirão Claro, referente ao local de captação de água para tratamento pela ETA; **SAS** – ponto de coleta de amostra de água do Córrego Santo Antônio, cujas águas estão sem a influência do efluente da ETA; **SAE** – ponto de coleta de amostra de água do Córrego Santo Antônio, cujas águas já estão contaminadas com o efluente da ETA; **RCM** – ponto de amostragem de água no Ribeirão Claro, a montante do recebimento das águas do córrego Santo Antônio contaminadas com o efluente da ETA; 5. **RCJ** – ponto de amostragem de água no Ribeirão Claro, a jusante do recebimento das águas do Córrego Santo Antônio (ponto de mistura completa das águas do Córrego Santo Antônio com o Ribeirão Claro); 6. **AAP** – ponto de amostragem de água no cavalete do consumidor. Os da primeira e segunda coleta os dados do Índice Mitótico foram submetidos ao teste de Anova, os dados do Índice de Genotoxicidade e Índice de Mutagenicidade ao teste de Kruskal Wallis. Já os resultados da terceira coleta os dados do Índice Mitótico, Índice de Genotoxicidade e Índice de Mutagenicidade foram submetidos ao teste Anova. Os resultados com * foram estatisticamente significativos ($p < 0,05$). **C1:** dados referentes a primeira coleta realizada em um período seco; **C2:** dados referentes a segunda coleta realizada em um período seco; **C3:** dados referentes a terceira coleta realizada em um período chuvoso.

A espécie *A. cepa* é um organismo teste muito utilizado em avaliações de contaminações aquáticas, por ser um bioindicador sensível de citogenotoxicidade e mutagenicidade, sendo altamente recomendado para monitoramento ambiental. O ensaio do Índice Mitótico (IM) avalia alterações na dinâmica de divisão celular, sendo um biomarcador efetivo de citotoxicidade (SANTOS; SOMMAGGIO; MARIN-MORALES, 2022).

No presente estudo, foi observado que os pontos RCM, RCJ e AAP da segunda coleta realizada (junho de 2020) apresentaram uma redução estatisticamente significativa na divisão celular, quando comparados ao CN. Por esses dados é possível inferir que essas amostras apresentaram agentes capazes de interferir no ciclo de divisão celular de meristemas radiculares de *A. cepa.* Abda et al. (2015) avaliaram a toxicidade de diferentes amostras de águas coletadas durante o processo de tratamento de água destinada ao abastecimento público. Os autores observaram que houve uma redução do IM de células meristemáticas de *A. cepa*, para todas as amostras estudadas, exceto de uma amostra coletada na primavera. Os autores associaram a redução do índice na amostra citada com a ação de trihalometanos, um subproduto da desinfecção por cloro, que pode ter aumentado o período G2 das células e bloqueado o ciclo celular das mesmas. A ETA estudada por Abda et al. (2015) utilizava cloro em algumas de suas etapas de tratamento, como o tratamento realizado na ETA de Rio Claro-SP. No presente estudo também foi observado redução do índice mitótico de meristemas expostos às amostras de água de abastecimento público (AAP). A água tratada e destinada ao abastecimento público pela ETA recebe gás cloro em alguns de seus processos, incluindo o de desinfecção, o que corrobora com as conclusões descritas por Abda et al. (2015), de que os subprodutos do Cl podem ser responsáveis pelas alterações na divisão celular.

Silveira et al. (2018) avaliaram os impactos de diferentes fontes de contaminação antropogênica sobre o rio Cascavel (PR), por meio de ensaios de citotoxicidade com o organismo teste *A. cepa*. Para esta avaliação foram realizadas duas coletas, em dois pontos distintos do rio (nascente do rio Cascavel e dentro da Lagoa Cascavel, que dista 1,6 km do primeiro ponto). O intervalo entre as coletas foi de 6 meses. Na primeira coleta, os dois pontos apresentaram um aumento do IM, quando comparados com os resultados do CN. Já, na segunda coleta, houve uma diminuição do IM, em relação ao CN. Os autores concluíram que tanto a nascente do rio Cascavel como todo o seu curso tiveram impactos significativos de ações antrópicas.

As alterações no material genético, promovidas pela ação de agentes tóxicos (genotoxicidade), podem ser permanentes, transmissível ou não para as células descendentes ou reversíveis. A ação de um agente genotóxico depende de vários fatores: característica da toxicidade; presença de reparo no sistema biológico, para o dano especifico; e eficiência do sistema de reparo presente nas células (KUMMROW; UMBUBEIRO, 2021). Os resultados dos ensaios de genotoxicidade das amostras coletadas nas 3 coletas realizadas no entorno da ETA de Rio Claro, mostraram que, na primeira coleta, apenas o AAP apresentou um índice estatisticamente significativo de genotoxicidade, quando comparado os resultados do CN. Na segunda coleta, contudo, nenhum dos pontos estudados apresentou resultados estatisticamente significativos em relação ao CN. Já na terceira coleta, todos os pontos estudados apresentaram resultados de genotoxicidade estatisticamente significativos, quando comparado ao CN, exceto o CAP. Os resultados de genotoxicidade da terceira coleta podem estar relacionados com o próprio período em que a coleta foi realizada (período chuvoso).

As chuvas frequentes e intensas, como as chuvas de verão do SE brasileiro, podem promover o carreamento de alguns contaminantes para o leito dos rios. As substâncias carreadas por essas chuvas podem ter diferentes origens: lavagem das vias públicas, sendo levadas para as galerias pluviais e, posteriormente para os leitos dos rios; o arraste (*runoff*) de contaminantes presentes nas margens dos rios, que pode ser mais intenso em regiões com mata ciliar degradada; os lançamentos de efluentes contaminados (legais ou clandestinos); contaminantes de outras regiões que são deslocados pela maior movimentação da coluna d'água; ou pela disponibilização de contaminante adsorvidos nos sedimentos, pelo revolvimento promovido no próprio rio. Todo esse aporte ocasional pode aumentar a disponibilização de substâncias tóxicas na coluna d'água, dentre elas as com características genotóxicas.

Gomes, Fernando e Dehini (2019) estudaram, por dois anos, três canais de água no Sri Lanka, para entender as fontes de poluição. Apenas o canal mais distante da cidade (área rural urbana) apresentou uma melhor qualidade da água na estação chuvosa. Os dois canais mais próximos da área urbana tiveram impacto significativo na qualidade de suas águas, que os autores associaram ao escoamento de contaminantes para esses canais.

A genotoxicidade registrada para todos os pontos avaliados no presente estudo, especificamente no período chuvoso, pode estar associada com os fatores descrito acima, com destaque para os *runoffs*, recebimento de efluente da ETA, recebimento da galeria pluvial e revolvimento dos sedimentos dos rios. Assim, as substâncias com potencial genotóxico podem ter sido carreadas para o Córrego Santo Antônio e transferidas para o Ribeirão Claro, o que não aconteceu no período seco. Diferenças entre a sazonalidade também foram observadas por Manzano et al. (2015). Esses autores monitoraram o potencial genotóxico das águas do Ribeirão Tatu (Limeira-SP), que está sob a influência de uma região altamente industrializada. Os resultados mostraram uma maior genotoxicidade das águas coletadas durante o período de chuvas intensas, toxicidade esta possivelmente decorrente de carreamento de contaminantes por *runoff*. Além disso, os autores concluíram que o Ribeirão Tatu também vem sendo impactado, de forma direta, pelos efluentes domésticos, industriais e agroquímicos que recebe ao longo de seu percurso, o que coloca em risco o material genético da biota associada a este recurso hídrico.

Os resultados obtidos na presente avaliação demonstram que o AAP apresentou um potencial citotóxico, para a segunda coleta; potencial genotóxico para a primeira e terceira coleta; e um potencial mutagênico para a segunda coleta. Esses resultados podem estar relacionados com os subprodutos da cloração utilizados em algumas etapas do processo de tratamento de água. Monitoramento da qualidade de água de torneira da região e Guelma (Argélia), realizado por Abda et al. (2015), mostraram que as amostras de água estudadas apresentaram efeitos genotóxicos para as células meristemáticas de *A. cepa.* Os autores relacionaram a presença das alterações cromossômicas com os subprodutos da desinfecção por cloro, pois a maior evidência de genotoxicidade foi observada em uma amostra coletada em um período com menor incidência de chuvas. De acordo com os autores, esse aumento pode estar relacionado com o aumento a concentração de matéria orgânica nesse período que, ao reagiu com o cloro, formou uma maior quantidade de subprodutos tóxicos. Além disso, os autores concluíram que os efeitos genotóxicos observados em sua avaliação foram maiores nas amostras de água recloradas do que na água bruta.

Ranjan, Mandal e Mandal (2019) avaliaram o potencial citogenotóxico de alguns subprodutos da desinfecção com cloro no organismo teste *A. cepa*. Os compostos testados foram o ácido trihaloacético, triclorometano e tribromometano. Nesta avaliação,

os valores de EC_{50} para *A. cepa,* para os três produtos testados (ácido trihaloacético, triclorometano e tribromometano) foram de 100 mg/L, 160 mg/L e 120 mg/L, respectivamente. Os autores observaram efeito clastogênico promovido por esses compostos, sendo que o ácido trihaloacético apresentou o maior potencial genotóxico, seguido do tribromometano e triclorometano.

O cloro é um eficiente agente desinfetante, mas deve ser realizado um controle do processo de cloração, desde a saída da água da estação de tratamento até as redes de distribuição. Esse monitoramento é importante para manter o nível de cloro seguro, minimizando a formação dos trihalometanos e outros possíveis subprodutos na água de consumo. Os trihalometanos podem ser formados devido a disponibilidade de seus precursores, por contaminação da água por resíduos domésticos, durante o transporte da água até chegar ao consumidor, ou por uma elevada concentração de cloro residual.

Além disso, os resultados observados na água de abastecimento podem ter relação com a presença de flúor. O flúor é adicionado à água de abastecimento público, para a prevenção de cáries. Sharma et al. (2017) alerta que elevadas concentrações de flúor na água pode ser tóxico para os organismos. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estabelece um limite considerado seguro para o flúor na água de abastecimento público, entre 1,0 mg/l e 1,5 mg/L (JHA; NAYAK; SHARMA, 2009). Estudos realizados por Thesai et al. (2021) com águas contaminadas com flúor mostraram que essas águas induziram um aumento das alterações cromossômicas e nucleares (aderência, perda, anáfase multipolar e células binucleadas) nas células meristemáticas do bioindicador *A. cepa*. Esses resultados alertam para a necessidade de se avaliar, com mais cautela, o potencial genotóxico e mutagênico da água destinada ao abastecimento público.

As alterações cromossômicas e nucleares registradas no presente estudo, para as células meristemáticas de *A. cepa*, estão apresentadas na Figura 2. Dentre as alterações observadas, as mais frequentes foram brotos nucleares (Figura 2.H), células binucleadas (Figura 2.O), pontes cromossômicas (2.L e 2.M), células poliploides (2.J), C-metáfase (2.I), aderências (2.K) e perdas cromossômicas (2.N). Os brotos nucleares podem ser decorrentes de processo de polipoidização, onde o material excedente que vai sendo deslocado para a periferia nuclear, até que se desprenda desse núcleo e forme um micronúcleo (FENECH; CROTT, 2002; FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2007; 2009).

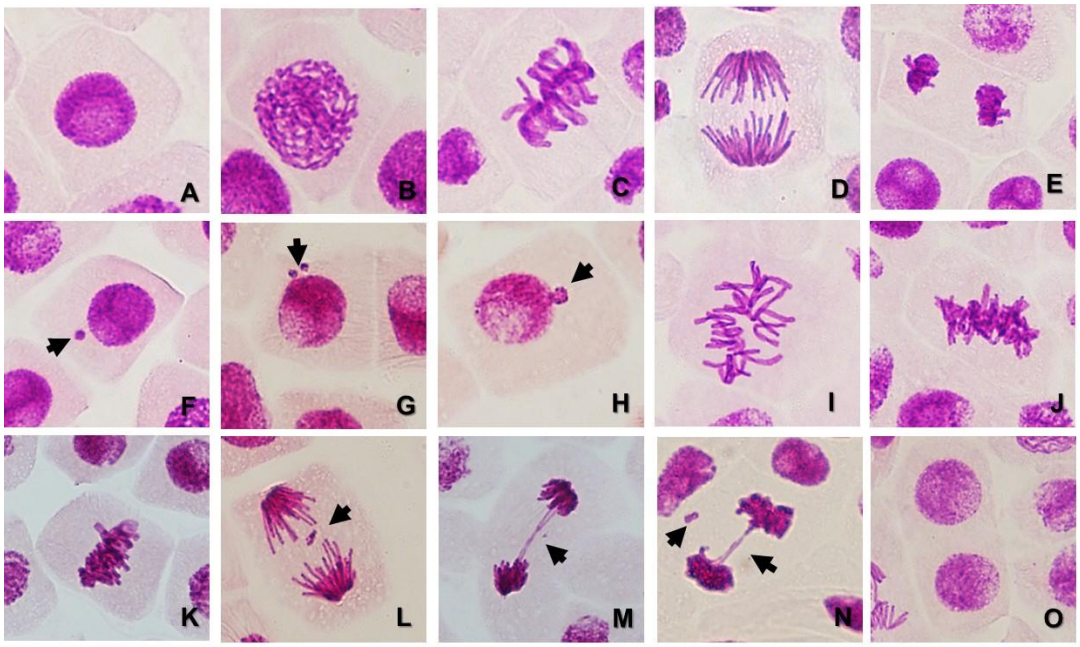
As alterações cromossômicas podem ser induzidas por ação de agentes aneugênicos ou clastogênicos. Os agentes aneugênicos são aqueles que atuam em estruturas citoplasmáticas, como os fusos mitóticos, impedindo, por exemplo a sua polimerização. Esse efeito tem como consequência a inativação dos fusos mitóticos, que leva ao impedimento da segregação dos cromossomos para os polos opostos, processo este essencial para o evento de divisão celular (FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2007; 2009). Já os agentes clastogênicos são aqueles que agem diretamente no material genético, promovendo alterações na estrutura cromossômica, como, por exemplo, quebras cromossômicas (FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2007; 2009; LEME; MARIN-MORALES, 2009).

As alterações cromossômicas observadas no presente estudo indicam a presença de substâncias com potencial aneugênico nas amostras de água avaliadas, uma vez que foram observadas alterações do tipo C-metáfases, metáfase poliplóides e metáfases com aderência cromossômica. As C-metáfases são decorrentes da inativação completa dos fusos mitóticos, não havendo assim a conexão dessas estruturas aos cinetócoros dos cromossomos, o que impossibilita a segregação dos cromossomos para os polos opostos, das células. Neste caso, as células podem entrar em novo processo de divisão, sofrendo assim polipoidização. As C-metáfases podem ainda derivar células com cromossomos aderidos (metáfases com aderência), evento que pode levar a célula à morte (FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2009; IQBAL et al., 2019). As aderências parciais podem induzir também pontes cromossômicas, tendo como consequência as quebras cromossômicas de origem aneugênica. As quebras cromossômicas podem também ocorrer devido a ação direta de um agente genotóxico, por interagir como o material genético (agentes intercalantes, adutos de DNA, promotores de *crosslink*, dentre outros). Neste caso ao agente indutor da alteração é considerado clastogênico.

As pontes cromossômicas podem ocorrer em decorrência de rearranjos cromossômicos ou pela formação de terminais coesivos (VENTURA-CAMARGO; ANGELIS; MARIN-MORALES, 2016). Já as perdas cromossômicas são provenientes de interferências parciais na polimerização dos fusos mitóticos. Neste caso, as cromátides irmãs não migram para os polos opostos da célula, se tornando cromossomos perdidos no citoplasma (FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2007).

As células binucleadas ocorrem quando há falhas no processo de citocinese (outro evento derivado da ação aneugênica do agente tóxico). Neste caso, ocorrem falhas ou interferências nos microfilamentos e microtúbulos envolvidos com o processo de citocinese, necessário para a separação das duas células filhas (TÜRKOĞLU, 2008). Já, os micronúcleos são formados por fragmentos acêntricos ou cromossomos inteiros que não foram incorporados ao núcleo principal das células, durante o processo de divisão celular. Assim, essas estruturas podem ser decorrentes tanto da ação de agentes aneugênicos como clastogênicos, conforme já citado anteriormente (FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2007; LEME; MARIN-MORALES, 2009).

Figura 2 – Alterações cromossômicas observadas em células meristemáticas de *Allium cepa*, após exposição das sementes às amostras de água coletadas em rios que sofrem influência da atividade da ETA, bem como da água destinada ao abastecimento público da cidade de Rio Claro-SP



Legenda: **A:** intérfase normal; **B:** prófase normal; **C:** metáfase normal; **D:** anáfase normal; **E:** telófase normal; **F:** intérfase com micronúcleo (seta); **G:** intérfase com dois micronúcleos (seta); **H:** intérfase com broto (seta); **I:** C-metáfase; **J:** metáfase poliplóide; **K:** metáfase com aderência cromossômica; **L:** anáfase com perda cromossômica (seta); **M**: anáfase com ponte cromossômica; N: anáfase com ponte e perda cromossômica; **O:** célula binucleada.

4. Conclusões

O monitoramento realizado com amostras de águas coletadas no Córrego Santo Antônio e no Ribeirão Claro, mostrou alterações sazonais, quanto a sua toxicidade e quanto aos seus parâmetros físicos e químicos.

Foi observado uma elevação da condutividade, baixa concentração de oxigênio dissolvido, aumento da turbidez, elevação da salinidade, aumento de fósforo, nitrogênio total e DBO, no córrego Santo Antônio (pontos SAS e SAE), elevação da DQO no ponto SAS do Córrego Santo Antônio quando comparado com os valores estabelecidos pela legislação vigente. Em relação as variáveis microbiológicas (coliformes totais, *Escherichia coli*, bactérias heterotróficas e fungos) foram registrados valores altos para as amostras coletadas nos corpos d'água, mostrando desconformidade com os padrões de qualidade da água, estabelecidos pela legislação, para rios de Classe II. O Córrego Santo Antônio, além de ser impactado pelos resíduos da lavagem dos decantadores e filtros da ETA, também sofre a influência de resíduos advindos da galeria de águas pluviais (SAS), possível carreamento de substâncias pelas chuvas e descarte irregular de resíduos domésticos e industriais sem tratamento prévio. Pela qualidade da água do ponto SAS e pela baixa vazão do rio, é possível inferir que esse corpo hídrico está altamente vulnerável à influência da área urbana de seu entorno.

Em relação ao Ribeirão Claro, foram observadas, na primeira amostragem, algumas alterações de pH e condutividade, acima do permitido para rios de Classe II. A concentração de fosforo ficou dentro dos padrões, estando acima apenas no RCJ, nas duas primeiras coletas. O RCJ também apresentou um aumento de nitrogênio total na terceira coleta. Os valores de OD foram inferiores a 5 mg/L O_2, para os dois pontos de coleta do Ribeirão Claro, na primeira e terceira coleta, valor este previsto como limite máximo para O.D. O RCM e RCJ também apresentaram valores de DBO acima do proposto pela legislação. O DQO do RCM apresentou valores acima de 20 mg/L O_2, para as duas primeiras coletas. Quanto às variáveis microbiológicas, foi observada uma alta presença de coliformes totais nos pontos deste rio, para todas as amostragens realizadas. Para *E. coli*, foram registrados valores acima dos estabelecidos pela legislação vigente, para a primeira e terceira coleta. Já para bactérias heterotróficas, foi encontrado alta de presença desses organismos para as três amostragens realizadas nos pontos deste rio. Assim, com relação a estes parâmetros, pode-se inferir que o descarte dos efluentes da

ETA não estão influenciando, de maneira drástica, a qualidade físico-química das águas deste corpo hídrico.

A água de abastecimento público, oferecida pela ETA não pode ser considerada potável, já que alguns dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos, estabelecidos pela portaria de consolidação da água do Ministério da Saúde (GN/MS nº. 88 de 2021, que altera a Portaria de Consolidação nº. 5, Anexo XX/2017) não foram cumpridos.

As amostras de água estudadas não apresentaram efeitos letais ao organismo *Lactuca sativa*. Contudo, os ensaios realizados com *Allium cepa* mostraram potencial genotóxico e mutagênico para a água de abastecimento público, que pode estar relacionado com os efeitos dos subprodutos da desinfecção por cloro e da fluoretação, bem como da presença de outros contaminantes decorrentes do processo de tratamento. Frente a esses resultados, cabe o alerta de que a qualidade da água destinada à população deve ser prioridade, conforme previsto na portaria de potabilidade da água. É de responsabilidade da Estação de Tratamento a garantia da segurança da água destinada ao abastecimento público, principalmente quanto a isenção de contaminantes com potencial tóxico. Ainda em relação aos resultados com o *A. cepa*, os pontos SAS, SAE, RCM e RCJ, apresentaram um potencial genotóxico na terceira coleta, realizada no período de chuva, assim, compostos com potencial genotóxico podem ter sido carreados para os corpos hídricos.

Os resultados obtidos nesta avaliação trazem importantes informações para as autoridades responsáveis pela ETA, bem como para os governantes do município, quanto a qualidade da água que está sendo oferecida a população, dados estes que devem servir de alerta e diretriz na busca constante da qualidade e segurança da água de abastecimento público da cidade de Rio Claro.

Os resultados obtidos no presente estudo confirmam a eficiência dos bioindicadores vegetais *L. sativa* e *A. cepa* utilizados, para o monitoramento dos recursos hídricos e da água destinada á população. Além disso, mais estudos devem ser realizados, para uma avaliação mais completa dos possíveis impactos que o descarte dos efluentes ETA promovem nos seus corpos hídricos receptores.

5. Referências Bibliográficas

ABDA, A. et al. Mutagenicity and genotoxicity of drinking water in Guelma region, Algeria. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 187, n. 2, 2015.

ANA, AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS; CETESB, COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Guia nacional de coleta e preservação de amostras - água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidos**. Brasília, 2011.

APHA, A. P. H. A.; AWWA, A. W. W. A.; WEF, W. E. F. **Standard Methods for the Examination of Water and Watewater**. 23. ed. Washington: American Public Health Association, 2017.

ARAUJO, F. V. DE et al. Avaliação da qualidade da água utilizada para irrigação na bacia do Córrego Sujo, Teresópolis, RJ. **Cadernos Saúde Coletiva**, v. 23, n. 4, p. 380–385, dez. 2015.

ARESPCJ, AGÊNCIA REGULADORA DOS SERVIÇOS DE SANEAMENTO DAS BACIAS DOS RIOS PIRACICABA, CAPIVARI E JUNDIAÍ. **Relatório de Fiscalização Técnica dos Sistemas de Água e Esgoto do Município de Rio ClaroRelatórios de Fiscalização**AmericanaARESPCJ, , 2015. Disponível em: <http://www.arespcj.com.br/arquivos/12/relatorios-de-fiscalizacao.aspx>

ASSIS, L. R. DE. **Avaliação do impacto em corpos d'água devido ao lançamento de resíduos de uma estação de tratamento de água de Juiz de Fora - MG**. Trabalho de Conclusão do Curso de Engenharia Ambiental e Sanitária—Juiz de Fora, Minas Gerais: Universidade Federal de Juiz de Fora, 2014.

BHATERIA, R.; JAIN, D. Water quality assessment of lake water: a review. **Sustainable Water Resources Management**, v. 2, p. 161–173, 2016.

BAI, Y. et al. Fungal Community as a Bioindicator to Reflect Anthropogenic Activities in a River Ecosystem. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 21 dez. 2018.

BRASIL, MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Resolução do CONAMA 357 - 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.** Brasil, 2005. Disponível em:

<https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Resolucao/2005/res_conama_357_2005_classificacao_corpos_agua_rtfcda_altrd_res_393_2007_397_2008_410_2009_430_2011.pdf>. Acesso em: 7 set. 2021.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Portaria de Consolidação no 5 de 2017 - Consolidação das normas sobre as ações e os serviços de saúde do Sistema Único de Saúde**. Brasil, 2017. Disponível em: <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/marco/29/PRC-5-Portaria-de-Consolida----o-n---5--de-28-de-setembro-de-2017.pdf>. Acesso em: 15 set. 2021.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Portaria GM/MM nº 888 de 2021 - Altera o Anexo XX da Portaria de Consolidação GM/MS nº 5 de 28 de setembro de 2017, para dispor sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para o consumo humano e seu perdão de potabilidade**, 2021. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/portaria-gm/ms-n-888-de-4-de-maio-de-2021-318461562>. Acesso em: 18 set. 2021.

CARITÁ, R.; MARIN-MORALES, M. A. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. **Chemosphere**, v. 72, n. 5, p. 722–725, 2008.

CHAPMAN, D. **Water Quality Assessments - A Guide to Use of Biota, Sedments and Water in Environmental Monitoring**. 2 ed. London: E&FN Spon - Chapman & Hall, 1996.

CETESB, COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Relatório de qualidade de águas superficiais no Estado de São PauloSão Paulo**, 2010.

CETESB, COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Apendice C - significado ambiental e sanitário das variáveis de qualidade das águas e dos sedimento metodologias analíticas e de amostragem - Relatório de Qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo.** São Paulo, Brasil, 2020a. Disponível em: <https://cetesb.sp.gov.br/aguas-interiores/publicacoes-e-relatorios/>. Acesso em: 19 jan. 2022

CETESB, COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Apêndice E - Índices de Qualidade das Águas**, São Paulo, Brasil, 2020b. Disponível em: <https://cetesb.sp.gov.br/aguas-interiores/publicacoes-e-relatorios/>. Acesso em: 18 abr.

2022

CLARK, S. C. **Operation guide to AWWA Standard G100: water treatment plant operation and management**. Denver: Association, American Water Works, 2011.

CUDOWSKI, A.; PIETRYCZUK, A.; HAUSCHILD, T. Aquatic fungi in relation to the physical and chemical parameters of water quality in the Augustów Canal. **Fungal Ecology**, v. 13, p. 193–204, fev. 2015.

COELHO, L. H. G. et al. Estrogenic Hormones in São Paulo Waters (Brazil) and Their Relationship with Environmental Variables and Sinapis alba Phytotoxicity. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 231, n. 4, 2020.

DAAE, DEPARTAMENTO DE ÁGUA E ESGOTO DE RIO CLARO. **Sistema de Tratamento da Água**. Disponível em: <https://daaerioclaro.sp.gov.br/sistema-de-tratamento-da-agua/>. Acesso em: 10 jan. 2022.

DE PÁDUA, V. L. Introdução ao tratamento de água. In: HELLE, L.; DE PÁDUA, V. L. (Eds.). . **Abastecimento de água para o consumo humano**. 2. ed. Belo Horizonte: Editora UFMG, 2010. p. 531–583.

DIAS, C. G.; LIBRANTZ, A. F. H.; DOS SANTOS, F. C. R. Modelagem e simulação de um ssitema inteligente para controle de dosagem da pós-cloração em estações de tratamento de água. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 25, n. 2, p. 323–332, 2020.

FADIRAN, A. O.; DLAMINI, S. C.; MAVUSO, A. A comparative study of the phosphate levels in some surface and ground water bodies of Swaziland. **Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia**, v. 22, n. 2, p. 197–206, 2008.

FENECH, M.; CROTT, J. W. Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes - Evidence for breakage-fusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 504, n. 1–2, p. 131–136, 2002.

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidizated cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 88, n. 3, p. 252–259, 2007.

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agent-Trifluralin herbicide. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, n. 6, p. 1680–1686, 2009.

FISKESJÖ, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, n. 1, p. 99–112, 1985.

GARCIA, J. M. et al. Degradação ambiental e qualidade da água em nascentes de rios urbanos. **Sociedade & Natureza**, v. 30, n. 1, p. 228–254, 2018.

GOMES, L. DA S. **Redes neurais artificiais aplicadas à inferência dos sinais de controle de dosagem de coagulantes em uma estação de tratamneto de água por filtração rápida**. 2012. 97f. Dissertação (Mestre em Engenharia Elétrica) - Fortaleza: Universidade Federam do Ceará, 2012.

IQBAL, M. et al. Bioassays based on higher plants as excellent dosimeters for ecotoxicity monitoring: A review. v. 5, n. 1, p. 1–80, 2019.

JHA, S. K.; NAYAK, A. K.; SHARMA, Y. K. Fluoride toxicity effects in onion (*Allium cepa* L.) grown in contaminated soils. **Chemosphere**, v. 76, n. 3, p. 353–356, 2009.

JOHNSTON, N. R.; STROBEL, S. A. Principles of fluoride toxicity and the cellular response: a review. **Archives of Toxicology**, v. 94, n. 4, p. 1051–1069, 2020.

KOHATSU, M. Y. et al. Fitotoxicidade de água superficial da Região Metropolitana de São Paulo utilizando bioensaio com Sinapis alba. **Acta Brasiliensis**, v. 2, n. 2, p. 58, 2018.

KUMMROW, F.; UMBUBEIRO, G. DE A. Estratégia para avaliação do efeito mutagênico. In: SALVADORI, D. M. F. et al. (Eds.). . **Da Toxicogenética a Toxicogenômica**. 1. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2021. p. 367.

LAMON, A. W. **Aplicação de microssensores no monitoramento de oxigênio dissolvido, potencial redox e temperatura em estudos limnológicos**. 2014. 139f. Dissertação (Mestre em Ciências da Engenharia Ambiental)—São Carlos: Universidade de São Paulo, 2014.

LAUGHINGHOUSE, H. D. et al. Biomonitoring genotoxicity and cytotoxicity of *Microcystis aeruginosa* (Chroococcales, Cyanobacteria) using the *Allium cepa* test. v. 432, p. 180–

188, 2012.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 682, n. 1, p. 71–81, 2009.

LI, W. et al. Concentration estimation of dissolved oxygen in Pearl River Basin using input variable selection and machine learning techniques. **Science of the Total Environment**, v. 731, p. 139099, 2020.

LIBÂNIO, M. **Fundamentos de Qualidade e Tratamento de Água**. 3ª ed. Campinas, São Paulo: Editora Átomo, 2010.

LYU, J. et al. Testing the toxicity of metals, phenol, effluents, and receiving waters by root elongation in *Lactuca sativa* L. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 149, n. November 2017, p. 225–232, 2018.

MA, M. et al. Effects and mechanisms of pre-chlorination on *Microcystis aeruginosa* removal by alum coagulation: Significance of the released intracellular organic matter. **Separation and Purification Technology**, v. 86, p. 19–25, 2012.

MANZANO, B. C. et al. Evaluation of the genotoxicity of waters impacted by domestic and industrial effluents of a highly industrialized region of São Paulo State, Brazil, by the comet assay in HTC cells. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 2, p. 1399–1407, 2015.

MOIMAZ, S. A. S. et al. Health surveillance: public water supply fluoridation in 40 municipalities of São paulo, Brazil. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 25, n. 7, p. 2653–2662, 2020.

OLIVEIRA, J. P. W.; SANTOS, R. N. DOS; BOEIRA, J. M. Genotoxicidade e Análises Físico-Químicas das águas do Rio dos Sinos (RS) usando *Allium cepa* e *Eichhornia crassipes* como bioindicadores. **BBR - Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 1, n. 1, p. 15–22, 2012.

OSIBANJO, O.; DASO, A. P.; GBADEBO, A. M. The impact of industries on surface water quality of River Ona and River Alaro in Oluyole Industrial Estate, Ibadan, Nigeria. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 4, p. 696–702, 2011.

PÁLL, E. et al. Human impact on the microbiological water quality of the rivers. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, n. 11, p. 1635–1640, 1 nov. 2013.

QI, J. et al. Prechlorination of algae-laden water: The effects of transportation time on cell integrity, algal organic matter release, and chlorinated disinfection byproduct formation. **Water Research**, v. 102, p. 221–228, 2016.

RANJAN, J.; MANDAL, T.; MANDAL, D. D. Environmental risk appraisement of disinfection by-products (DBPs) in plant model system: *Allium cepa*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 9, p. 8609–8622, 2019.

REALI, M. A. P.; PAZ, L. P. S.; DANIEL, L. A. Tratamento de água para o consumo humano. In: CALIJURI, M. DO C.; CUNHA, D. G. F. (Eds.). . **Engenharia Ambiental: Conceitos, Tecnologia e Gestão**. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda., 2013. p. 402–453.

REIS, E. L. T. DOS et al. Identificação da influência do descarte de lodo de estações de tratamento de água. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 865–872, 2007.

RICHTER, C. A. Sedimentação e Decantação. In: HEMFIBRA, T. EM S. (Ed.). **Água: Métodos e Tecnologia de Tratamento**. São Paulo: Editora Blucher, 2009. p. 159–218.

ROBERTO, M. M. 165 f. **Avaliação de recursos hídricos sob a influência de atividade de uma indústria do petróleo, por meio de análises ecotoxicológicas integradas a parâmetros ambientais**. Doutorado em Ciências Biológicas - Biologia Celular e Molecular—Rio Claro, SP: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,165 f. 2014.

ROSARIO, C. G. A. **Avaliação da disposição de lodo gerado nume estação de tratamento de água em reator anaeróbio de fluxo ascendente e manto de lodo (UASB)**. 2007. 115f. Dissertação (Mestrado em Engenharia)—São Paulo: Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, 2007.

SANTOS, L. A. R. DOS; MICHELAN, D. C. DE G. S.; JESUS, T. M. DE. Verificação da produção de lodo de ETA em função da quantidade e da qualidade da água. **Revista Brasileira de Engenharia de Biossistemas**, v. 15, n. 2, p. 235–258, 2021.

SHARMA, D. et al. Fluoride: A review of pre-clinical and clinical studies. **Environmental**

Toxicology and Pharmacology, v. 56, n. April, p. 297–313, 2017.

SILVEIRA, M. A. D. et al. Direct and Indirect Anthropogenic Contamination in Water Sources: Evaluation of Chromosomal Stability and Cytotoxicity Using the *Allium cepa* Test. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 100, n. 2, p. 216–220, 2018.

SOBRERO, M. C.; RONCO, A. Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L). In: GABRIELLA CASTILO MORALES (Ed.). . **Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas**. México: [s.n.]. p. 71–80.

SRIVASTAV, A. L.; PATEL, N.; CHAUDHARY, V. K. Disinfection by-products in drinking water: Occurrence, toxicity and abatement. **Environmental Pollution**, v. 267, p. 115474, 2020.

THESAI, A. S. et al. Bioaccumulation of fluoride from aqueous system and genotoxicity study on *Allium cepa* using *Bacillus licheniformis*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 407, n. October 2020, p. 124367, 2021.

TÜRKOĞLU, Ş. Evaluation of genotoxic effects of sodium propionate, calcium propionate and potassium propionate on the root meristem cells of *Allium cepa*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 6, p. 2035–2041, 2008.

VENTURA-CAMARGO, B. D. C.; ANGELIS, D. DE F. DE; MARIN-MORALES, M. A. Assessment of the cytotoxic, genotoxic and mutagenic effects of the commercial black dye in *Allium cepa* cells before and after bacterial biodegradation treatment. **Chemosphere**, v. 161, p. 325–332, 2016.

Artigo 2: Avaliação dos impactos de efluentes não tratados de Estação de Tratamento de Água (ETA) sobre corpos hídricos receptores, por meio de bioensaios com Células HepG2 / C3A

Gigeck, Letícia de Souza[1]; da Silva, Adriana Fabiana Corrêa[1]; Gonçalves, Letícia Rocha[1]; Sommaggio, Laís Roberta Deroldo[1]; Marin Morales, Maria Aparecida[1]

[1]UNESP – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Departamento de Biologia Geral e Aplicada, Instituto de Biociências, Avenida 24A, nº 1515, CEP: 13506-900, Rio Claro, São Paulo, Brasil.
Autor correspondente: marin.morales@unesp.br

RESUMO

Os recursos hídricos têm grande importância para a manutenção dos organismos vivos, mas, pelos constantes impactos recebidos de ações humanas, estão comprometendo a sua qualidade. Assim, as águas brutas captadas para o abastecimento público devem passar por tratamentos eficientes, que garantam à qualidade das mesmas, antes delas serem disponibilizada à população. A água que chega nas Estações de Tratamento de Água (ETA) passam por etapas de purificação química e desinfecção, para que atendam às exigências de potabilidade. Durante o tratamento realizado nas ETA, são gerados alguns resíduos que, se também não forem tratados adequadamente, podem impactar, negativamente os recursos hídricos onde são descartados. A ETA da cidade de Rio Claro (SP) lança os resíduos gerados no processo de lavagem dos filtros e dos decantadores, *in natura,* em corpos hídricos (Córrego Santo Antônio e Ribeirão Claro). O presente estudo avaliou a qualidade dos corpos hídricos de captação, receptores do efluente da ETA e de abastecimento público gerada por esta ETA, por meio de ensaios de citotoxicidade (ensaio do MTT) e de genotoxicidade (ensaio do micronúcleo e do cometa), tanto com amostras coletadas no período seco como no período chuvoso. Foram amostrados (amostragem compostas) 6 diferentes pontos: água de captação da ETA (CAP); água do córrego Santo Antônio sem influência do efluente da ETA (SAS); água do córrego Santo Antônio com influência do efluente da ETA (SAE); agua do Ribeirão Claro, a montante do recebimento

do efluente da ETA (RCM); água do Ribeirão Claro, a jusante do lançamento do efluente da ETA (no ponto de mistura completa) (RCJ); e água do cavalete do consumidor (AAP). Pelo ensaio do MTT, não foi observada citotoxicidade para nenhuma das amostras testadas, nas três amostragens realizadas. Já para o Ensaio do Micronúcleo com Bloqueio de Citocinese os pontos SAS, SAE RCM e AAP apresentaram potencial genotóxico, em pelo menos uma das coletas. E em relação ao Ensaio do Cometa, só a AAP, na primeira coleta, apresentou potencial genotóxico. Os resultados do estudo mostram que o córrego Santo Antônio, por ter apresentado potencial genotóxico e devido à sua localização estritamente urbana, é um recurso hídrico altamente vulnerável à contaminação urbana. O potencial genotóxico da água de abastecimento público serve de alerta sobre a possibilidade de estar havendo a geração de subprodutos tóxicos derivados da desinfecção por cloro.

Palavras chaves: citotoxicidade; genotoxicidade; ensaio do MTT; ensaio do micronúcleo; ensaio do cometa.

1. INTRODUÇÃO

Toda a água de abastecimento público deve submetida a processos de tratamentos eficientes, antes de ser disponibilizada à população. As Estações de Tratamento de Água (ETA) são construções responsáveis pelo tratamento das águas brutas que são captadas nos recursos hídricos, e pela disponibilização de água segura e de boa qualidade para a população. As ETA devem adotar procedimentos seguros e capazes de remover microrganismos patogênicos; diminuir a presença de substâncias orgânicas e orgânicas; reduzir a cor, sabor, odor e turbidez da água captada, parâmetros estes que são essenciais para o atendimento dos padrões de potabilidade estabelecidos pela legislação (Portaria GM/MS nº 888 de 2021, que altera o Anexo XX da Portaria de Consolidação nº 5 de 2017) (BRASIL, 2017; BRSIL 2021). Assim, as ETA devem seguir protocolos distintos, de acordo com as características específicas do corpo hídrico usado para captação (ROSARIO, 2007; DE PÁDUA, 2010).

A ETA do município de Rio Claro/SP capta suas águas no Ribeirão Claro e adota o procedimento de tratamento convencional, que consiste das etapas de floculação, desinfecção e fluoretação (DAAE - Rio Claro, 2022). A primeira etapa de tratamento da ETA é a pré-cloração. Nesta etapa, a água captada recebe cloro para a desinfecção da água bruta. A cloração também auxilia no controle de crescimento de algas; permite uma melhor floculação, pois aumenta o potencial de coagulação; oxida substâncias presentes na água, o que auxilia a degradação de poluentes (MA et al., 2012; QI et al., 2016; DIAS; LIBRANTZ; DOS SANTOS, 2020;). Além da cloração é adicionado ao sistema compostos coagulantes (no caso da ETA, o cloreto férrico), que permitem uma melhor remoção das partículas suspensas na coluna d'água, pois possibilitam que estas partículas se juntem e formem aglomerados (processo de coagulação). Posteriormente, a água segue para tanques de coagulação (decantadores), onde irão ser formados flocos maiores e mais pesados (floculação) que, pela ação da gravidade, depositam-se no fundo de tanques (decantação). O material decantado forma um lodo, que é removido dos tanques periodicamente, pelo processo de lavagem. Com a lavagem dos decantadores, se forma um efluente que é descartado *in natura* em uma galeria de água pluvial, que desemboca no Córrego Santo Antônio, (afluente do Ribeirão Claro). Após a decantação e retirada do lodo dos decantadores, a água, já livre de impurezas, é submetida ao processo de filtração, por diferentes sistemas de filtragem (cascalho, areia grossa, areia fina e carvão), que retém os flocos que não decantaram e removem outros resíduos menores. Pós

processo de filtração, os filtros são lavados e a água de lavagem é descartada *in natura*, conjuntamente, com as águas dos decantadores na galeria pluvial citada.

A filtração torna o próximo processo (desinfecção) mais eficiente, bem como corrigi algumas falhas dos processos anteriores (LIBÂNIO, 2010; CLARK, 2011; GOMES, 2012). Na desinfecção, a água tratada recebe adição de compostos químicos, para a eliminação de agentes patogênicos como bactérias e vírus. Nessa etapa, as ETA podem associar outros tratamentos aos tratamentos químicos, como, por exemplo, o de radiação UV e de ozonização (SRIVASTAV; PATEL; CHAUDHARY, 2020). No caso da ETA de Rio Claro, a desinfecção somente é feita pelo tratamento químico com cloro gás. Por fim, antes da distribuição dá água tratada para a população, é adicionado nesta água flúor, conforme recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) (MOIMAZ et al., 2020), para tratamento adjuvante na prevenção de cáries dentárias.

O descarte dos efluentes produzidos pelas ETA, na maioria das vezes, é feito sem tratamento prévio, o que pode se caracterizar como um crime ambiental. Esses descartes indevidos comprometem a qualidade de corpos d'água, inclusive daqueles que serão usados, a jusante do descarte, para novas captação, que irão requer, muitas vezes, tratamentos avançados, para a sua desinfecção. Assim, ao mesmo tempo que as ETA são importantes para a purificação das águas de abastecimento público, elas também podem se caracterizar como fontes de poluição dos recursos hídricos (ACHON, 2008. Então, as ETA devem, além de ser responsáveis pela desinfecção da água destinada ao consumo público, se responsabilizar pelo tratamento adequados dos resíduos que gera.

Pelo fato da ETA de Rio Claro descartar seus efluentes *in natura* nos corpos hídricos, é de extrema importância avaliar o comprometimento que esta ETA está causando nos recursos hídricos receptores de seus efluentes, bem avaliar a qualidade da água que está sendo destinada ao consumo humano. Também é importante estabelecer estratégias que visem melhorias para um descarte seguro desses resíduos. Para esta avaliação, foram realizados bioensaios que seguem as indicações descritas na literatura de uso de sistemas testes de curta duração (VAN STRAALEN, 1998; LI; ZHENG; LIU, 2010) como as culturas celulares originadas de células isoladas de um dado tecido, cultura primária ou mesmo uma linhagem celular estável (PHILIPPEOS et al., 2011; LÉO et al., 2014). A linhagem celular HepG2 é constituída por células de hepatoma humano, portanto de

característica metabolizadora (apresentam enzimas que são ativadas por drogas ou xenobióticos), muito utilizadas em estudos de toxicidade, bem como na avaliação da ação biológica de compostos genotóxicos (VALENTIN-SEVERIN et al., 2003; GUO et al., 2011; ŠTAMPAR et al., 2021). Neste estudo foi utilizado a linhagem HepG2/C3A, que corresponde a um clone da HepG2 (COLTMAN et al., 2021). O presente estudo teve como objetivo avaliar e monitorar os impactos citotóxicos e genotóxicos que o descarte *in natura* dos efluentes da ETA (Rio Claro – SP / Brasil) promovem nos rios receptores, bem como avaliar a qualidade do tratamento realizado pela ETA da cidade de Rio Claro-SP.

2. MATERIAL E MÉTODO

2.1 Característica da ETA Estudada

A ETA utiliza o sistema convencional de tratamento de água (floculação, decantação, filtração, desinfecção e fluoretação). A captação de água é feita no Ribeirão Claro, corpo d'água enquadrado na classe de rios de Classe II, conforme Resolução CONAMA 357, órgão consultivo e deliberativo de meio ambiente brasileiro.

A ETA tem como características de tratamento a correção do pH com cal hidratada; a pré-cloração e desinfecção feita com o gás cloro; o cloreto férrico como agente coagulante; floculação hidráulica e decantação convencional; filtração do tipo rápida (filtros de cascalho, areia grossa e areia fina); e fluoretação automática (Relatório ARESPCJ, 2015). A ETA não adota nenhum processo de tratamento ou desidratação do lodo gerado, descartando todo o seu efluente de tratamento, in natura, no córrego Santo Antônio, um afluente do Ribeirão Claro.

2.2 Pontos de Coleta

Os pontos de coleta definidos para monitorar a qualidade das águas do córrego Santo Antônio, do Ribeirão Claro e da água de abastecimento público foram: 1. CAP – ponto de captação da ETA; 2. SAS – córrego Santo Antônio, cujas águas estão sem a influência do efluente da ETA; 3. SAE – córrego Santo Antônio, cujas águas já tem a influência do efluente da ETA (este ponto está localizado 100 m antes da confluência do córrego com o Ribeirão Claro); 4. RCM – Ribeirão Claro, antes do recebimento das águas

do córrego Santo Antônio, contaminadas com o efluente da ETA; 5. RCJ – Ribeirão Claro, a jusante do recebimento das águas do Córrego Santo Antônio, contaminada com o efluente da ETA (ponto de mistura completa das águas do córrego Santo Antônio com o Ribeirão Claro); 6. AAP – ponto de coleta de amostra de água no cavalete do consumidor. A amostragem deste último ponto foi realizada, nas duas primeiras coletas, na Escola Estadual Professora Carolina Augusta Seraphim e, na terceira coleta, na praça da Avenida Ulisses Guimarães, situada entre as Avenidas 24 e 22, Vila Indaiá, Rio Claro – SP (Figura 1).

A água de abastecimento público da última coleta não foi realizada na escola estadual Professora Carolina Augusta Seraphim, pois a campanha de coleta foi feita em um sábado, dia em que a escola se encontra fechada. As amostras do SAE, RCM, RCJ foram coletadas dentro da Floresta Estadual Edmundo Navarro de Andrade (FEENA).

Figura 1 – Esquema ilustrativo dos pontos de coletas

Legenda: Pontos de coletas realizados para avaliação da qualidade da água: **CAP** – Ribeirão Claro – local da captação de água para tratamento pela ETA; **SAS** – Córrego Santo Antônio sem a influência do efluente da ETA; **SAE** – Córrego Santo Antônio contaminadas com o efluente da ETA; **RCM** – Ribeirão Claro, a montante do recebimento das águas do córrego Santo Antônio contaminadas com o efluente da ETA; 5. **RCJ** – Ribeirão Claro, a jusante do recebimento das águas do córrego Santo Antônio (ponto de mistura completa das águas do córrego Santo Antônio com o Ribeirão Claro); 6. **AAP** – água de abastecimento público coletada no cavalete do consumidor.

Todas as amostragens realizadas nas três coletas seguiram os protocolos estabelecidos e dispostos no Manual de coleta de amostras da ANA e CETESB (ANA; CETESB, 2011). As amostras obtidas foram separadas em alíquotas, acondicionadas em tubos de centrifuga de 50 mL e armazenadas em geladeira, até seu uso nos ensaios.

2.3 Bioensaio com Cultura de Células HepG2 / C3A

As células HepG2/C3A utilizadas neste estudo foram obtidas no Banco de Células do Rio de Janeiro. Para a realização dos ensaios com essa cultura celular, as amostras de água foram submetidas a uma correção do pH (~ 7,2) processo de filtração com filtro com membranas de 0,22 µm. Essa filtração teve como finalidade, para esterilizar a amostra, antes da exposição das células às amostras (ABBAS et al., 2019). As células foram mantidas em frascos de cultura de 25 cm² e cultivadas em 5 mL de meio DMEM (suplementado com 10% de soro fetal bovino e 2% de solução de antibiótico-antimicótico (penicilina 10.000 U.I./mL/ estreptomicina 10 mg/mL, Cultilab) em estufa de 5% de CO_2 a 37 °C, até atingir 80% de confluência.

2.3.1 Ensaio do MTT

O ensaio do MTT foi realizado conforme descrito por Mosmann (1983), com algumas modificações, são preparados plaqueamento com suspensão celular de 4,6 x 10^4 células por poço da placa de 96 poços (exceto nos poços destinados ao branco). A placa foi incubada em estufa a 37 °C com 5% de CO_2, por 24 horas, para a aderência e estabilização das células. Após a estabilização, foram adicionados 200 µL de cada amostra em seus respectivos poços, sendo que foram preparadas 5 diferentes diluições para a realização do teste: 100, 250, 500, 750 e 1000 µL de amostra/mL de meio DMEM incompleto. Para o controle positivo (CP) do teste MTT foi utilizado Triton X-100 a 1%, diluído em meio DMEM incompleto. Nos poços referentes ao controle negativo (CN) e branco, foi acrescentado apenas meio DMEM incompleto. Na sequência, as placas foram mantidas por 24 horas em estufa a 37 °C com 5% de CO_2. Em seguida, foi preparada a solução de MTT e 145 µL em cada poço, seguido de incubação por 3 horas, em estufa de CO_2, protegidas da luminosidade. Depois das 3 horas de exposição do MTT, o conteúdo da placa foi retirado e adicionados 100 µL de DMSO, para a leitura da absorbância por

espectrometria, com filtro de 540 nm. O procedimento foi realizado para todas as amostras nas três coletas.

2.3.2 Ensaio do Micronúcleo com Bloqueio de Citocinese

O ensaio do micronúcleo com bloquei de citocinese (MN), são preparados pré-frascos com suspensão celular de 2 $x10^6$ células e 5 mL de meio DMEM completo com soro. Os frascos foram incubados por 24 horas em 5% de CO_2, a temperatura de 37 ºC e com umidade de 80%, para a aderência e estabilização das células aos frascos de cultura. Para este ensaio foi utilizado como Controle Negativo (CN) meio DMEM completo e como Controle Positivo (CP) o MMS (metilmetano sulfonato a $1,06X10^{-3}$ M). Passadas as 24 horas de estabilização, as células foram expostas aos controles e aos tratamentos que não excederam a 20% de amostra por 24 horas na incubadora de CO_2. Passado esse tempo, os meios foram trocados e adicionado a Citocalasina-B e novamente acondicionadas na incubadora por 30 horas

Após 30 horas de ação da Citocalasina-B, foram realizadas as coletas da suspensão celular. Em que o meio é armazenado em tubo de centrifuga, as células são lavadas com PBS e adicionado 500 µL de Tripsina a 0,5%, por 5 min, para o despregamento das células da parede dos frascos. A Tripsina é inativada com o meio previamente armazenado e foi utilizado uma seringa para o despregamento das células da parede do frasco e o conteúdo foi colocado em tubo de centrifuga para ser submetido a centrifugação de 1500 rpm por 5 min. Após a centrifugação o sobrenadante é retirado e misturado 5 mL de Citrato de Sódio a 1% e homogeneizado delicadamente por 40 vezes e contabilizado o tempo de 5 min para homogeneização, para que fossem adicionadas 2 gotas de formol. Novamente os tubos foram centrifugados e foram adicionados 5 mL de Carnoy (etanol e ácido acético na proporção 3:1; v/v), a mistura foi homogeneizado delicadamente, e os tubos acondicionados a 4 ºC.

Para a confecção das lâminas, os tubos foram retirados da geladeira e centrifugados a 1500 rpm por 5 min. O sobrenadante foi retirado com o auxílio de uma pipeta Pasteur de vidro e a suspensão foi homogeneizada, assim em uma lâmina foram pingadas algumas gotas da suspensão celular e, em seguida, a lâmina foi passada pela, chama para a fixação do material. Para a coloração das células, as lâminas foram submetidas a

uma hidrólise ácida, com HCl 1N por 10 min a 60ºC, depois colocadas em uma cuba contendo o Reativo de Schiff, por 2 horas. Passado esse período, as lâminas floram deixadas para secar em temperatura ambiente, para depois serem coradas com Giemsa.

A análise das lâminas do ensaio do Micronúcleo foi realizada em objetiva de 100X de microscópio de luz. Foram avaliadas 500 células (mononucleadas, binucleadas e multinucleadas), para a obtenção do CBPI por réplica, totalizando 3000 células por tratamento. Além disso, foram analisadas 1000 células binucleadas por réplica ou 6000 células por tratamento, em que foram observadas alterações como MN, broto nucleares, pontes nucleoplasmáticas e alterações compostas (células com MN e ponte; MN e broto ou ponte e broto), para a determinação do potencial genotóxico da amostra testado. Tal procedimento foi aplicado para as três coletas.

Os dados de CBPI e das alterações cromossômicas foram submetidos a análise estatística, primeiramente pelo teste de normalidade Shapiro-Wilk ($n < 50$) e o teste de a homogeneidade de variância Brown-Forsythe. Quando os resultados dos testes apresentaram distribuição normal ($p>0,05$), foi utilizado o teste estatístico ANOVA um fator, e quando as amostras não apresentaram distribuição normal ($p<0,05$), foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis.

2.3.3 Ensaio de Viabilidade Celular e Ensaio do Cometa

Para o Ensaio do Cometa, é necessária a realização do teste de viabilidade com o Azul de Trypan. Para a continuidade do ensaio, é necessária uma viabilidade ceda ordem de 80%, entre todas as triplicatas das amostras e dos controles (Negativo e Positivo).

Para a realização do ensaio do cometa, são preparados pré-frascos com suspensão celular de 5 $x10^5$ células e 5 mL de meio DMEM completo com soro. Os frascos foram incubados por 24 horas em 5% de CO_2, a temperatura de 37 ºC e com umidade de 80%, para a aderência e estabilização das células aos frascos de cultura. Para este ensaio foi utilizado como Controle Negativo (CN) meio DMEM completo e como Controle Positivo (CP) o MMS (metilmetano sulfonato a $4X10^{-2}$ M). Passadas as 24 horas de estabilização, as células foram expostas aos controles e aos tratamentos que não excederam a 20% de amostra por 24 horas na incubadora de CO_2.

Posteriormente, os meios foram descartados, as células lavadas com PBS e adicionado aos frascos 500 µL de Tripsina a 0,5% por 5 min, para o desprendimento das células da parede dos frascos. A Tripsina foi inativada pela adição de 5 mL de meio completo e foi utilizado a seringa de 1 mL para desfazer os grumos das células e obter células individualizadas. Em seguida, a suspensão celular foi transferida para tubos de centrifuga e centrifugada por 5 min a 1500 rpm. Após a centrifugação, foi retirado o sobrenadante e o material do frasco foi homogeneizado.

Para o teste de viabilidade celular com o Azul de Trypan, foi retirado 20 µL de suspensão celular (de cada frasco), que foi misturado, em tubo de centrífuga, com 20 µL de Azul de Trypan. Os 40 µL foram transferidos para uma lâmina, que foi usada para contabilizar, sob microscopia de luz, 100 células, dentre elas as brancas (células vivas) e as azuis (células mortas), para cada uma das réplicas dos tratamentos. Após a contabilização, foi verificado se as células apresentaram viabilidade igual ou superior a 80%, necessária para dar continuidade ao ensaio do cometa.

Para a confecção das lâminas do ensaio do cometa, foram misturados 40 µL de suspensão celular e 240 µL de agarose LMP (baixo ponto de fusão). Desta mistura, 120 µL foram distribuídos em 2 lâminas, previamente identificadas e gelatinizadas com agarose. A lâmina foi recoberta com lamínula e acondicionadas em geladeira, por 15 min, para a solidificação do material. Após a solidificação, as lamínulas foram retiradas das lâminas, e as lâminas colocadas na solução de lise por 1 hora. Posteriormente, as lâminas foram acondicionadas na cuba de eletroforese, contendo o tampão de corrida alcalino gelado e as lâminas foram dispostas na cuba de eletroforese, por 20 minutos, para a estabilização e desnaturação do DNA e, depois da corrida em eletroforese a 39V, 300 mA por mais 20 min. Na sequência, as lâminas foram retiradas da cuba e colocadas em uma cubeta de vidro preenchida com solução de neutralização por 5 minutos por 3 vezes. As lâminas foram, então fixadas com etanol P.A., por 10 minutos. As lâminas foram coradas com GelRed (50 µL) e lidas em microscópio de fluorescência. Para a leitura das lâminas, foi utilizado software Comet Assay IV. Foram analisados 100 nucleóides por réplica, totalizando 300 nucleóides por tratamento. O parâmetro analisado pelo software foi o de intensidade da cauda (*tail intensity*), cujos resultados da leitura passaram por retirada de *outliers*, para depois serem submetidos a análise estatística (BRIANEZI; DE CAMARGO; MIOT, 2009; YANUARYSKA, 2018).

A análise estatística, passou, primeiramente, pelo teste de normalidade Shapiro-Wilk ($n < 50$) e pelo teste de homogeneidade de variância Brown-Forsythe. Quando os resultados dos testes apresentaram distribuição normal ($p>0,05$) foi utilizado o teste estatístico ANOVA um fator, e quando as amostras não apresentaram distribuição normal ($p<0,05$), foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os efluentes produzidos pelas ETA durante os processos de lavagem dos filtros e dos decantadores (lodo do decantador) devem passar por tratamentos adequados, antes de serem lançados em recursos hídricos, pois podem conter compostos tóxicos que promovem a descaracterização da qualidade das águas que recebem esses efluentes e, consequentemente, o desequilíbrio desses ecossistemas (BIANCHI et a al., 2015). No entanto, a maioria das ETA não realiza tratamento adequado ou mesmo nem realiza qualquer tipo de tratamento, antes de laçá-los nos corpos hídricos. Esses descartes inadequados podem impactar severamente o meio aquático e ser considerado como crime ambiental (ACHON, 2008; SANTOS; MICHELAN; JESUS, 2021).

A ETA de Rio Claro (SP) lava periodicamente os seus decantadores e diariamente os filtros. Todos os resíduos advindos dessas lavagens são descartados, sem nenhum tratamento, em uma galeria de água pluvial que desemboca em um pequeno córrego canalizado da cidade de Rio Claro (Córrego Santo Antônio). O Córrego Santo Antônio é um afluente do Ribeirão Claro (um importante rio da região), que é afluente do rio Corumbataí, rio este que abastece parte do município de Piracicaba (SP). Devido a essa dinâmica de possível transferência de contaminantes entre os rios citados, é necessário investigar o tipo de comprometimento que os efluentes da ETA possam estar promovendo nos corpos hídricos receptores. Essa investigação deve ser realizada por meio de bioensaios de curta duração, que forneçam resultados seguros e rápidos, quanto a toxicidade dos resíduos presentes nos efluentes da ETA. Os ensaios *in vitro* são ensaios de curta duração muito utilizados para esse fim, sendo que as linhagens metabolizadoras, como as células HepG2/C3A, estão entre as linhagens mais utilizadas para detectar e avaliar toxicidade de compostos químicos. Essas células têm uma maior capacidade de refletir o metabolismo de xenobióticos do que outros modelos *in vitro* que necessitam de

ativação metabólica exógena para conferirem o mesmo resultado da avaliação (GÁBELOVÁ et al., 2004).

O Ensaio do MTT (3(4-5-dimetil-2-tiazol)-2-5-difenilbrometo de tetrazólio)) é um marcador de citotoxicidade que foi utilizado para avaliar o potencial citotóxico das águas de todos os pontos de coleta, das três diferentes amostragens realizadas no presente estudo. Por este teste, foi possível observar que na primeira coleta os pontos CAP, SAE, RCJ foram citotóxicos, e na segunda coleta os pontos RCM e AAP também foram citotóxicos na diluição de 1000 µL de amostra/Ml, já que apresentaram uma viabilidade celular abaixo de 80% para as células HepG2/C3A (Tabela 1). Este ensaio também é, convencionalmente, utilizado para determinar a diluição adequada a ser utilizada no Ensaio do Micronúcleo com Bloqueio de Citocinese e Ensaio do Cometa. De acordo com Reifferscheid et al. (2008) e Hara e Marin-Morales (2017), é recomendado que sejam utilizadas nos ensaios a porcentagem de 20% de amostra de água coletada, em relação ao meio de cultura, pois as alterações na osmolaridade conferidas por esse volume de amostra não influenciaram na citotoxicidade ou genotoxicidade.

Tabela 1 – Resultados do ensaio do MTT das três coletas realizadas

Pontos	Diluição µL/mL)														
	100			250			500			750			1000		
	C1	C2	C3	C1	C2	C3	C1	C2	C3	C1	C2	C3	C1	C2	C3
CN	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
CAP	10	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	**72**	83	100
SAS	100	100	100	100	100	100	97	100	100	90	100	100	91	85	100
SAE	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	**72**	86	100
RCM	100	100	100	100	100	100	97	100	100	90	95	99	91	**67**	89
RCJ	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	**72**	88	96
AAP	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	**74**	96

Legenda: Pontos de coletas realizados para avaliação da qualidade da água: **CAP** – Ribeirão Claro – local da captação de água para tratamento pela ETA; **SAS** – Córrego Santo Antônio sem a influência do efluente da ETA; **SAE** – Córrego Santo Antônio contaminadas com o efluente da ETA; **RCM** – Ribeirão Claro, a montante do recebimento das águas do córrego Santo Antônio contaminadas com o efluente da ETA; 5. **RCJ** – Ribeirão Claro, a jusante do recebimento das águas do córrego Santo Antônio (ponto de mistura completa das águas do córrego Santo Antônio com o Ribeirão Claro); 6. **AAP** – água de abastecimento público coletada no cavalete do consumidor. **C1:** primeira coleta; **C2:** segunda coleta; **C3:** terceira coleta. Os valores destacados em negrito correspondem aos resultados inferiores a 80% de viabilidade para as células HepG2/C3A.

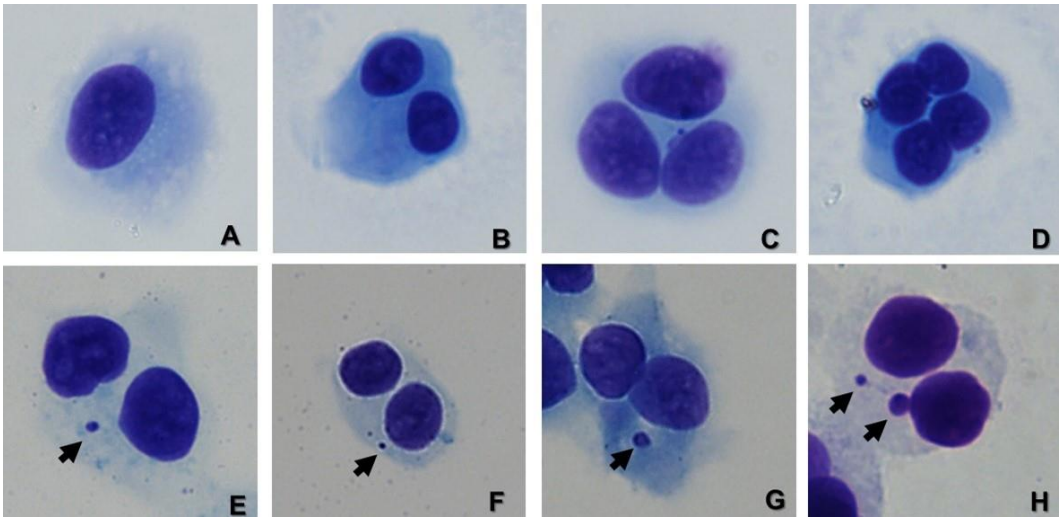
O Ensaio do Micronúcleo com Bloqueio de Citocinese é um teste de genotoxicidade que detecta, principalmente, a frequência de micronúcleos (MN) em células que foram expostas a um determinado agente de investigação. Os MN são formados por fragmentos cromossômicos acêntricos ou por cromossomos inteiros que foram perdidos durante o processo de divisão celular (FENECH; CROTT, 2002). Neste ensaio, também podem ser observadas outras alterações celulares, como brotos nucleares e pontes nucleoplasmáticas, bem como a incidência de mais de uma alteração em uma mesma célula binucleada. Pelos resultados obtidos no presente estudo foi verificada, para todos os ensaios, uma menor frequência de brotos e pontes nucleoplasmáticas, quando comparado com a frequência de micronúcleos. De acordo com a OECD (2016a), a alteração mais relevante a ser analisada neste ensaio é frequência de MN nas células binucleadas. Na Tabela 2, estão apresentados os resultados obtidos nos ensaios do MN, para células binucleadas com broto e micronúcleo, bem como a soma destas alterações (Figura 2).

Tabela 2 – Resultado do potencial genotóxico das amostras de água de captação (Ribeirão Claro), do córrego Santo Antônio e do Ribeirão Claro (montante e jusante) e da água de abastecimento público pelo Ensaio do Micronúcleo com Bloqueio de Citocinese, com cultura de células HepG2/C3A

Pontos	Micronúcleo			Micronúcleo + Broto			Soma das Alterações		
	C1	C2	C3	C1	C2	C3	C1	C2	C3
CN	9,38 ± 4,45	6,83 ± 4,45	10,50 ± 6,25	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	9,83 ± 4,45	6,83 ± 4,45	10,50 ± 6,25
CP	34,50 ± 3,21 *	20,33 ± 6,47 *	38,50 ± 7,01 *	0,50 ± 0,55	0,00 ± 0,00	4,33 ± 2,07 *	35,00 ± 3,29 *	20,33 ± 6,47 *	42,83 ± 8,01 *
CAP	9,50 ± 4,97	9,00 ± 3,46	15,00 ± 6,60	0,33 ± 0,52	0,00 ± 0,00	0,33 ± 0,52	9,83 ± 5,34	9,00 ± 3,46	15,33 ± 6,92
SAS	12,33 ± 4,76	14,67 ± 5,79 *	21,00 ± 6,45 *	1,50 ± 1,38 *	0,67 ± 0,82	1,33 ± 1,63	13,83 ± 5,60	15,33 ± 6,25 *	22,33 ± 8,02 *
SAE	13,83 ± 2,32	15,67 ± 3,27 *	19,00 ± 4,38	0,50 ± 0,55	0,33 ± 0,52	0,83 ± 0,41	14,33 ± 2,58	16,00 ± 3,10 *	19,83 ± 4,36
RCM	10,00 ± 2,97	13,83 ± 4,45	15,50 ± 2,81	0,67 ± 0,52	0,33 ± 0,82	0,67 ± 1,03	13,00 ± 4,69	14,17 ± 3,10	16,17 ± 3,13
RCJ	8,00 ± 3,69	11,00 ± 2,65	20,00 ± 6,46 *	0,00 ± 0,00	0,20 ± 0,45	1,20 ± 1,10	8,00 ± 3,69	11,20 ± 2,59	21,20 ± 4,32 *
AAP	16,33 ± 7,12	15,33 ± 5,75 *	17,33 ± 6,59	0,50 ± 0,55	0,17 ± 0,41	0,67 ± 1,21	16,83 ± 7,00	15,50 ± 5,65 *	18,00 ± 7,16

Legenda: CN: Controle Negativo; **CP:** Controle Positivo (MMS). **CAP** – ponto de coleta no Ribeirão Claro, referente ao local de captação de água para tratamento pela ETA; **SAS** – ponto de coleta de amostra de água do Córrego Santo Antônio, cujas águas estão sem a influência do efluente da ETA; **SAE** – ponto de coleta de amostra de água do Córrego Santo Antônio, cujas águas já estão contaminadas com o efluente da ETA; **RCM** – ponto de amostragem de água no Ribeirão Claro, a montante do recebimento das águas do córrego Santo Antônio contaminadas com o efluente da ETA; 5. **RCJ** – ponto de amostragem de água no Ribeirão Claro, a jusante do recebimento das águas do Córrego Santo Antônio (ponto de mistura completa das águas do Córrego Santo Antônio com o Ribeirão Claro); 6. **AAP** – ponto de amostragem de água no cavalete do consumidor. Os dados de Micronúcleo, Micronúcleos e Brotos e a Soma destas Alterações foram submetidos ao teste de Anova (primeira, segunda e terceira coleta). Os resultados com * foram estatisticamente significativos ($p < 0,05$). **C1:** dados referentes a primeira coleta realizada em um período seco; **C2:** dados referentes a segunda coleta realizada em um período seco; **C3**: dados referentes a terceira coleta realizada em um período chuvoso.

Figura 2 – Imagens das alterações do Ensaio do Micronúcleo com Bloqueio de Citocinese com as células HepG2/C3A, expostas às amostras de águas de coleta dos rios sob a influência do descarte do efluente da ETA de Rio Claro SP



Legenda: **A:** células mononucleadas**; B:** células binucleadas; **C e D:** células multinucleadas; **E a G:** células binucleadas com micronúcleos; **H:** célula binucleada com micronúcleo e broto.

Nesta avaliação, é utilizada a Citocalasina-B, que é uma substância que impede a citocinese de células que já passaram pelo processo de divisão nuclear, levando a formação de células binucleadas. A inibição da citocinese se dá pela inibição da polimerização dos microfilamentos de actina, que impede a formação do anel contrátil, responsável pela separação do citoplasma e a divisão final da célula (FENECH, 2000). O Índice de Proliferação Celular com Bloqueio da Citocinese (CBPI) é determinado pela proporção de células mononucleadas, binucleadas e multinucleadas (com três ou mais núcleos), formadas pós exposição das células a um agente tóxico (Figura 2) (FENECH et al., 2003; OECD, 2016a). Na Tabela 3 estão apresentados os resultados de CBPI obtidos para as amostras de água coletadas nas três diferentes amostragens. Neste ensaio, não foram registrados resultados significativos de alteração da proliferação celular, para nenhuma das amostras testadas, exceto para a água do RCJ da terceira coleta (período chuvoso). Dessa forma, não foi observado uma inibição da divisão celular para as amostras testadas.

Tabela 3 – Resultados de citotoxicidade obtidos com o Índice do CBPI no Ensaio do Micronúcleo com Bloqueio de Citocinese com cultura de células HepG2/C3A

Ponto	CBPI		
	C1	C2	C3
CN	1,74 ± 0,10	1,82 ± 0,08	1,74 ± 0,06
CP	1,63 ± 0,08	1,90 ± 0,12	1,69 ± 0,09
CAP	1,78 ± 0,07	1,77 ± 0,05	1,69 ± 0,07
SAS	1,81 ± 0,08	1,76 ± 0,09	1,81 ± 0,02
SAE	1,67 ± 0,08	1,85 ± 0,07	1,81 ± 0,03
RCM	1,84 ± 0,07	1,72 ± 0,07	1,83 ± 0,03
RCJ	1,75 ± 0,13	1,80 ± 0,08	1,89 ± 0,07 *
AAP	1,73 ± 0,08	1,76 ± 0,06	1,76 ± 0,07

Legenda: **CN:** Controle Negativo; **CP:** Controle Positivo (MMS). **CAP** – ponto de coleta no Ribeirão Claro, referente ao local de captação de água para tratamento pela ETA; **SAS** – ponto de coleta de amostra de água do Córrego Santo Antônio, cujas águas estão sem a influência do efluente da ETA; **SAE** – ponto de coleta de amostra de água do Córrego Santo Antônio, cujas águas já estão contaminadas com o efluente da ETA; **RCM** – ponto de amostragem de água no Ribeirão Claro, a montante do recebimento das águas do córrego Santo Antônio contaminadas com o efluente da ETA; 5. **RCJ** – ponto de amostragem de água no Ribeirão Claro, a jusante do recebimento das águas do Córrego Santo Antônio (ponto de mistura completa das águas do Córrego Santo Antônio com o Ribeirão Claro); 6. **AAP** – ponto de amostragem de água no cavalete do consumidor. Os dados da primeira e segunda coleta foram submetidos ao teste de Anova, enquanto que os dados da terceira coleta foram submetidos ao teste de Kruskal Wallis. Os resultados com * foram estatisticamente significativos ($p < 0,05$). C1: dados referentes a primeira coleta realizada em um período seco; C2: dados referentes a segunda coleta realizada em um período seco; C3: dados referentes a terceira coleta realizada em um período chuvoso.

A partir destes resultados, podemos inferir que o Córrego Santo Antônio está sofrendo com os impactos antrópicos, principalmente no ponto SAS, já que o mesmo está canalizado juntamente com a galeria de águas pluviais. As alterações observadas para o ensaio do MN, nesse ponto amostrado, podem ser decorrentes da influência de resíduos urbanos carreados para o córrego, mas também pode estar havendo algum descarte irregular na galeria pluvial, pois, como descrito no Artigo 1 (Tabela 2, pag. 73) deste estudo, foi observado, para a terceira amostragem realizada para esse ponto, pH extremamente alcalino (pH 13,0), bem como alta condutividade (1,7 mS/cm) e elevada salinidade (1,1 g/L). Esses dados físico-químicos demonstram que este córrego, que está localizado, estritamente, na área urbana, é extremamente vulnerável aos impactos antrópicos. Com relação aos resultados obtidos com no ponto SAE, para a amostra coletada na segunda amostragem, as alterações observadas para este ponto podem não

ser decorrentes somente da influência dos efluentes na ETA, mas principalmente do impacto antrópico repassado do ponto SAS para o SAE. Como citado anteriormente, a proximidade entre esses pontos permite essa transferência de contaminantes entre eles. Os resultados obtidos para o ponto RCJ, na terceira coleta de amostra (período chuvoso) os impactos observados podem ser decorrentes de influência de contaminação externa, possivelmente carreada das margens para o leito do Ribeirão Claro.

Ribeiro, Barcelos e d'Arce (2014) avaliaram o potencial genotóxico do rio São Francisco – PR, após recebimento de efluente, sem tratamento prévio, de uma Estação de Tratamento de Esgoto (ETE), por meio de ensaios do MN com *Astyanax paranae*, um peixe que nativo da região. Para esta avaliação, foram realizadas coletas, nas quatro estações do ano (primavera, verão, outono e inverno), na cidade de Cascavel, após o lançamento de efluente sem tratamento prévio, de uma ETE; entre as cidades de Cascavel e Toledo; e na cidade de Toledo. Os autores observaram frequências significativas de MN induzidas por todas as amostras testadas, comparadas as do CN. Para o ponto sobre a influência do efluente da ETE, foi registrado uma maior frequência de MN, em relação aos demais pontos de coleta de amostras. Os autores sugerem que a diminuição da frequência dos MN nos pontos a jusante da emissão do efluente da ETE, pode ser decorrente do aumento de volume de água no rio São Francisco, pelo recebimento das águas de melhor qualidade de seus afluentes, e também pela distância entre os pontos amostrados.

Fuzinatto et al. (2013) avaliaram o potencial genotóxico de amostras do rio Cubatão do Sul (Florianópolis/SC), por meio do ensaio do MN, realizado com o bioindicador com *Oreochromis niloticus*. Nesta avaliação os autores observaram que a frequência de MN foi desencadeada pela ação dos agrotóxicos, já que os pontos amostrados do rio estão localizados em uma região agrícola. Esses dados comprovam a necessidade de se avaliar, continuamente, a qualidade dos corpos hídricos que recebem diferentes impactos antrópicos, dentre eles os efluentes de ETA e ETE, que são lançados sem tratamento ou após tratamento inadequado nos ambientes aquáticos.

O Ensaio do Cometa consiste em uma metodologia de análise do potencial genotóxico de compostos químicos. Neste teste podem ser detectadas lesões do DNA que são passíveis de reparo, não resultando em mutações, portanto ele pode ser utilizado em estudos de reparo do DNA. O ensaio do cometa, em sua versão alcalina, permite

detectar quebras de fita simples ou duplas no DNA (CONTIJO; TICE, 2003; SANTOS et al., 2021).

Antes da realização do Ensaio do Cometa, foi realizado o teste de viabilidade celular com o Azul de Trypan. Neste teste, todos os pontos das três amostragens apresentaram viabilidade acima de 80%. Na Tabela 4, estão apresentados os resultados obtidos para a intensidade da cauda (*tail intensity* - TI) das duas primeiras amostragens realizadas (ambas no perído de seca). O Ensaio do Cometa não foi realizado para a última amostragem de água (período chuvoso), devido a problemas técnicos com o microscópio de fluorescência. Na primeira amostragem, a água do ponto AAP apresentou resultado significativo para TI, confirmando o potencial genotóxico dessa amostra. Como o ensaio do Cometa pode detectar quebras na fita dupla ou simples, que podem ter sido promovidas por ações do sistema de reparo celular do organismo, as alterações observadas podem ter sido, então, corrigidas. Assim, por este teste, não é possível afirmar que as alterações observadas decorreram em danos permanentes nas célula. Para essa cerficação, é necesário a realização de estudos comparativos, obtidos em outros bioensaios.

Tabela 4 – Resultados obtidos para a análise do potencial genotóxico, pelo Ensaio do Cometa (intensidade da cauda), realizado com amostras de água do período seco

Pontos	Intensidade da Cauda	
	C1	C2
CN	8,02 ± 1,72	10,45 ± 2,56
CP	25,57 ± 7,88 *	43,38 ± 8,47 *
CAP	9,30 ± 2,36	10,44 ± 1,26
SAS	10,50 ± 2,01	8,92 ± 2,08
SAE	11,89 ± 1,37	6,55 ± 1,78
RCM	10,73 ± 2,27	10,80 ± 2,21
RCJ	11,72 ± 2,45	9,38 ± 2,17
AAP	12,66 ± 1,46 *	10,06 ± 1,32

Legenda: CN: Controle Negativo; **CP:** Controle Positivo (MMS). **CAP** – ponto de coleta no Ribeirão Claro, referente ao local de captação de água para tratamento pela ETA; **SAS** – ponto de coleta de amostra de água do Córrego Santo Antônio, cujas águas estão sem a influência do efluente da ETA; **SAE** – ponto de coleta de amostra de água do Córrego Santo Antônio, cujas águas já estão contaminadas com o efluente da ETA; **RCM** – ponto de amostragem de água no Ribeirão Claro, a montante do recebimento das águas do córrego Santo Antônio contaminadas com o efluente da ETA; 5. **RCJ** – ponto de amostragem de água no Ribeirão Claro, a jusante do recebimento das águas do Córrego Santo Antônio (ponto de mistura completa das águas do Córrego Santo Antônio com o Ribeirão Claro); 6. **AAP** – ponto de amostragem de água no cavalete do consumidor. Os dados de tail intensity da primeira coleta foram submetidos ao teste de Kruskal Wallis. Já os dados da segunda coleta foram submetidos ao teste de Anova. Os resultados com * foram estatisticamente significativos ($p < 0,05$). **C1:** dados referentes a primeira coleta realizada em um período seco; **C2:** dados referentes a segunda coleta realizada em um período seco.

Ao compararmos os resultados do Ensaio do Cometa com os resultados do Ensaio do MN do ponto APP, é possível sugerir que o potencial genotóxico observado para a primeira amostragem, pelo Ensaio do Cometa, possa estar relacionado com reparo celular, pois não foi observado para esse ponto, na primeira amostragem, incidência significativa de micronúcleos.

Dentre os subprodutos formados pela desinfecção com o cloro estão os trihalometanos, ácidos haloacéticos, halonitrometanos, haloacetonitrilas, cloroaminas, cloro fenóis e cloral ou brometo hidratado (CORTÉS; MARCOS, 2018). Dong et al. (2019) detectaram em seus estudos realizados com amostras de água de torneira e do sistema de distribuição da água, que 40% dos subprodutos da desinfecção por cloro eram de trihalometanos e 50% de ácidos haloacéticos.

Zhang et al. (2012) avaliaram, por meio do Ensaio do Cometa com cultura de células HepG2, o potencial genotóxico de alguns subprodutos da desinfecção, dentre eles quatro trihalometanos, seis ácidos haloacéticos, três haloacetonitrilas, o 3-cloro-4-(diclorometil)-5-hidroxi-2(5H)-furanona (MX) e hidrato de cloral (CH). Como resultado, todos os trihalometanos testados se mostraram com potencial genotóxico, sendo que o bromodiclorometano desencadeou mais danos do que dribromoclorometano, tribromometano e triclorometano, mostrando assim que os trihalometanos bromados apresentam um maior risco genotóxico, em relação aos clorados. Os triahalometanos constituem a classe mais comum de subprodutos da desinfecção por cloro e, em alguns estudos, tais compostos foram associados ao um maior risco de câncer de bexiga ou retal. Entre os ácidos haloacéticos, o que apresentou maior significância de indução de danos ao DNA foi o ácido iodoacetico, seguindo por ácido bromoacético, ácido dibromoacético, ácido dicloroacético e ácido tricloroacético, sendo os ácidos iodoacético e bromoacético os compostos com maior potencial genotóxico, dentre os estudados pelos autores. A formação de ácidos haloacéticos está associada ao uso de cloroaminas, dióxido de cloro e ozônio para a desinfecção. Em relação aos haloacetonitrilas, todos os compostos testados (dibromoacetonitrila, dicloroacetonitrila e tricloroacetonitrila,) apresentaram um potencial genotóxico e estes compostos são formados como subproduto da desinfecção com a cloramina, cloro e dióxido de cloro. Em relação ao MX, que é formado pela ação do cloro com compostos húmicos presentes na água de abastecimento público, a concentração de 100 µM foi tóxico para HepG2. Esse composto foi classificado como um agente carcinogênico altamente potente para humanos. O último composto testado foi o CH que apresentou genotoxicidade a 20 µM, sendo mais detectado em tratamentos da água que utilizam ozônio ou dióxido de cloro para a desinfeção.

Ferreti et al. (2020) avaliaram a água bruta (reservatório de captação), água que passou pelo processo de tratamento de água após a desinfecção, e água distribuída para a polução da Ilha de Sardenha (Itália). Nesta avaliação foram utilizados diferentes bioensaios *in vitro* com cultura de células HepG2, para avaliar o potencial genotóxico das amostras de água, dentre eles o Ensaio do Cometa e o Ensaio do Micronúcleo com Bloqueio de Citocinese. Os autores observaram que todas as amostras avaliadas foram consideradas genotóxicas pelo Ensaio do Cometa, mas não pelo ensaio do MN. Os autores concluírem que Ensaio do Cometa se mostrou mais sensível que o do Ensaio do Micronúcleo, para avaliação de genotoxicidade de amostras de água envolvidas com abastecimento público. Eles sugeriram que os efeitos genotóxicos observados nas células

HepG2, pelo Ensaio do Cometa, podem estar relacionados à presença de íons clorito e clorato nas amostras de água tratada, formados pela decomposição do dióxido de cloro. Como todos os ensaios realizados pelos autores apresentaram potencial genotóxico, eles ressaltam que os subprodutos da desinfecção estão presentes, em baixas concentrações na água, mas uma exposição a longo prazo pode aumentar o risco de efeitos danosos à saúde humana.

4. Conclusões

Com os resultados obtidos neste estudo, podemos concluir que o Córrego Santo Antônio, vem sendo impactado por ações antrópicas, pois este corpo d'água recebe resíduos advindos de uma galeria de águas pluviais, que podem ter características genotóxicas. Foi observado que o ponto SAS, apresentou resultados significativos de genotoxicidade, pelo Ensaio do Micronúcleo com Bloqueio de Citocinese, realizado com cultura de células HepG2/C3A. Esses resultados comprovam a presença de substâncias genotóxicas neste corpo d'água, antes mesmo do córrego receber o descarte do efluente da ETA. O ponto SAE, também apresentou potencial genotóxico, pelo Ensaio do Micronúcleo, para a segunda coleta, cujo resultado pode estar relacionado aos resíduos genotóxicos do SAS, associados aos compostos presentes no efluente da ETA.

O ponto RCM também apresentou potencial genotóxico, na terceira coleta, que pode estar relacionado com o período de chuva, que carreou, por *runoff*, compostos com potencial genotóxico para o leito do rio, pois neste ponto, o rio ainda não recebeu a influência do efluente da ETA.

A água de abastecimento público (AAP) apresentou um potencial genotóxico, para as águas da segunda coleta, detectada pelo Ensaio do Micronúcleo, e para a primeira, pelo Ensaio do Cometa. Tais resultados podem estar relacionados com os efeitos dos subprodutos da desinfecção por cloro, que podem ser formados durante ou após o processo de desinfecção. Conforme citado por diversos pesquisadores, o cloro usado em desinfecção, pode produzir subprodutos, como o os trihalometanos e os ácidos haloacéticos, que apresentam potencial tanto genotóxicos como mutagênicos. Por esta razão, os trihalometanos são controlados pela Portaria 36 GM/MS de 1990 (BRASIL, 1990).

Os resultados obtidos no presente estudo, principalmente os relacionados às características da água de abastecimento público, servem de alerta, quanto aos cuidados que devem ser dirigidos aos subprodutos da desinfecção utilizado pela ETA, pois, dependendo do subproduto formado, pode conferir risco de genotoxicidade à saúde humana, mesmo em pequenas concentrações. Fica também um alerta de que as águas de abastecimento público são isentas de contaminantes, podendo ser usadas, inclusive, como controle negativo de experimentos científicos. A toxicidade aqui observada já seria suficiente para influenciar os resultados de ensaios toxicológicos.

5. Referências Bibliográficas

ACHON, C. LAGUNA. **Ecoeficiência de sistemas de tratamento de água à luz dos conceitos da iso 14.001**. Doutorado m Hidráulica e Saneamento—São Carlos: Universidade de São Paulo, 2008.

ANA, AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS; CETESB, COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Guia nacional de coleta e preservação de amostras - água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidos**. Brasília, 2011.

BIANCHI, E. et al. Evaluation of genotoxicity and cytotoxicity of water samples from the Sinos River Basin, southern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 75, n. 2 suppl, p. 68–74, maio 2015.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Portaria nº 36/MS/GM - Aprova normas e Padrões de Potabilidade da Água destinada ao consumo humano.** Brasil, 1990.

BRIANEZI, G.; DE CAMARGO, J. L. V.; MIOT, H. A. Desenvolvimento e validação de técnica quantitativa de análise de imagem para avaliação do teste do cometa corado pela prata. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 45, n. 4, p. 325–334, 2009.

CLARK, S. C. **Operation guide to AWWA Standard G100: water treatment plant operation and management**. Denver: Association, American Water Works, 2011.

COLTMAN, N. J. et al. Application of HepG2/C3A liver spheroids as a model system for genotoxicity studies. **Toxicology Letters**, v. 345, p. 34–45, 2021.

CONTIJO, Á. M. DE M. C.; TICE, R. Teste do cometa para a detecção de danos no DNA e reparo em células individualizadas. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Eds.). . **Mutagênese Ambiental**. Canoa: [s.n.]. p. 247–279.

CORTÉS, C.; MARCOS, R. Genotoxicity of disinfection byproducts and disinfected waters: A review of recent literature. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 831, n. April, p. 1–12, 2018.

DAAE, D. A. DE Á. E E. DE R. **Sistema de Tratamento da Água**. Disponível em: <https://daaerioclaro.sp.gov.br/sistema-de-tratamento-da-agua/>. Acesso em: 10 jan. 2022.

DE PÁDUA, V. L. Introdução ao tratamento de água. In: HELLE, L.; DE PÁDUA, V. L. (Eds.). . **Abastecimento de água para o consumo humano**. 2. ed. Belo Horizonte: Editora UFMG, 2010. p. 531–583.

DIAS, C. G.; LIBRANTZ, A. F. H.; DOS SANTOS, F. C. R. Modelagem e simulação de um ssitema inteligente para controle de dosagem da pós-cloração em estações de tratamento de água. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 25, n. 2, p. 323–332, 2020.

DONG, F. et al. Evidence-based analysis on the toxicity of disinfection byproducts in vivo and in vitro for disinfection selection. **Water Research**, v. 165, p. 114976, nov. 2019.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 455, n. 1–2, p. 81–95, 2000.

FERETTI, D. et al. Genotoxicity of source, treated and distributed water from four drinking water treatment plants supplied by surface water in Sardinia, Italy. **Environmental Research**, v. 185, n. August 2019, p. 109385, 2020.

FUZINATTO, C. F. et al. Induction of micronucleus of Oreochromis niloticus exposed to waters from the Cubatão do Sul River, southern Brazil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 98, p. 103–109, 2013.

GÁBELOVÁ, A. et al. Genotoxicity of environmental air pollution in three European cities: Prague, Košice and Sofia. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 563, n. 1, p. 49–59, 2004.

GOMES, L. DA S. **Redes neurais artificiais aplicadas à inferência dos sinais de controle de dosagem de coagulantes em uma estação de tratamneto de água por filtração rápida**. Mestre em Engenharia Elétrica—Fortaleza: Universidade Federam do Ceará, 2012.

GUO, L. et al. Similarities and Differences in the Expression of Drug-Metabolizing Enzymes between Human Hepatic Cell Lines and Primary Human Hepatocytes □. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 39, n. 3, p. 528–538, 2011.

HARA, R. V.; MARIN-MORALES, M. A. In vitro and in vivo investigation of the genotoxic potencial of waters from rivers under the influence of a petroleum refinery (São Paulo - State - Brazil). **Chemosphere**, v. 174, p. 321–330, 2017.

LEME, D. M. et al. Cytotoxicity of water-soluble fraction from biodiesel and its diesel blends to human cell lines. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 8, p. 2148–2155, 2011.

LÉO, P. et al. Células Animais: conceitos básicos. In: MORAES, Â. M.; AUGUSTO, E. F. P.; CASTILHO, L. R. (Eds.). . **Tecnologia do Cultivo de Células Animais de Biofármacos a Terapia Gênica**. São Paulo: Editora Roca, 2014. p. 15–41.

LI, L.; ZHENG, B.; LIU, L. Biomonitoring and bioindicators used for river ecosystems: Definitions, approaches and trends. **Procedia Environmental Sciences**, v. 2, p. 1510–1524, 2010.

LIBÂNIO, M. **Fundamentos de Qualidade e Tratamento de Água**. 3ª ed. Campinas, São Paulo: Editora Átomo, 2010.

MA, M. et al. Effects and mechanisms of pre-chlorination on Microcystis aeruginosa removal by alum coagulation: Significance of the released intracellular organic matter. **Separation and Purification Technology**, v. 86, p. 19–25, 2012.

MOIMAZ, S. A. S. et al. Health surveillance: public water supply fluoridation in 40 municipalities of São paulo, Brazil. **Ciencia e Saude Coletiva**, v. 25, n. 7, p. 2653–2662, 2020.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assy for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55–

63, 1983.

OECD, O. FOR E. C. AND D. **OECD Guideline for the testing of chemicals - In vitro Mammalian Cell Micronucleus Test**, 2016a.

OECD, O. FOR E. C. AND D. **OECD Guideline for the testing of chemicals - In vivo Mammalian Alkaline Comet Assay**, 2016b.

PHILIPPEOS, C. et al. Introduction to Cell Culture. In: MITRY, R. R.; HUGHES, R. D. (Eds.). . **Human Cell Culture Protocols Methods in Molecular Biology**. 3. ed. [s.l.] Springer Science & Business Media, 2011. p. 1–13.

QI, J. et al. Prechlorination of algae-laden water: The effects of transportation time on cell integrity, algal organic matter release, and chlorinated disinfection byproduct formation. **Water Research**, v. 102, p. 221–228, 2016.

REIFFERSCHEID, G. et al. Measurement of genotoxicity in wastewater samples with the in vitro micronucleus test-Results of a round-robin study in the context of standardisation according to ISO. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 649, n. 1–2, p. 15–27, 2008.

RIBEIRO, D. L.; BARCELOS, G. R. M.; D'ARCE, L. P. G. Genotoxic effects of water from São Francisco River, Brasil, in Astyanax paranae. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 93, p. 274–279, 2014.

ROSARIO, C. G. A. **Avaliação da disposição de lodo gerado nume estação de tratamento de água em reator anaeróbio de fluxo ascendente e manto de lodo (UASB)**. Mestrado em Engenharia—São Paulo: Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, 2007.

SANTOS, L. A. R. DOS; MICHELAN, D. C. DE G. S.; JESUS, T. M. DE. Verificação da produção de lodo de ETA em função da quantidade e da qualidade da água. **Revista Brasileira de Engenharia de Biossistemas**, v. 15, n. 2, p. 235–258, 2021.

SANTOS, R. A. DOS et al. Ensaio do Cometa. In: SALVADORI, D. M. F. et al. (Eds.). . **Da Toxicogenética a Toxicogenômica**. 1. ed. Rio de Janeiro: Editora Atheneu, 2021. p. 117–145.

SOUZA, P. M. S. et al. PBAT biodegradable mulch films: Study of ecotoxicological impacts using *Allium cepa*, *Lactuca sativa* and HepG2/C3A cell culture. **Chemosphere**, v. 256, p. 126985, 2020.

ŠTAMPAR, M. et al. Science of the Total Environment Hepatocellular carcinoma (HepG2 / C3A) cell-based 3D model for genotoxicity testing of chemicals. **Science of the Total Environment**, v. 755, 2021.

VALENTIN-SEVERIN, I. et al. Use of HepG2 cell line for direct or indirect mutagens screening : comparative investigation between comet and micronucleus assays. **Mutation Research**, v. 536, p. 79–90, 2003.

VAN STRAALEN, N. M. Evaluation of bioindicator systems derived from soil arthropod communities. **Applied Soil Ecology**, v. 9, n. 1–3, p. 429–437, 1998.

YANUARYSKA, R. D. Comet Assay Assessment of DNA Damage in Buccal Mucosa Cells Exposed to X-Rays via Panoramic Radiography. **Journal of Dentistry Indonesia**, v. 25, n. 1, p. 53–57, 2018.

ZHANG, L. et al. Comparison of DNA damage in human-derived hepatoma line (HepG2) exposed to the fifteen drinking water disinfection byproducts using the single cell gel electrophoresis assay. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 741, n. 1–2, p. 89–94, 2012.

5 CONCLUSÕES GERAIS

A avaliação realizada nas águas do Córrego Santo Antônio e do Ribeirão Claro, para estimar os possíveis impactos promovidos pelo descarte de efluentes, *in natura*, produzidos pela Estação de Tratamento de Água, foi extremamente importante, pois permitiu um melhor conhecimento não só sobre a qualidade, mas também sobre a vulnerabilidade desses recursos hídricos que recebem impactos de diferentes fontes de contaminação.

A ETA estudada do município de Rio Claro-SP vem, por décadas, contribuindo para a distribuição de água potável de qualidade para a população, cumprindo com a resoluções nacionais que preconizam a segurança da água. Contudo, essa mesma ETA, que purifica a água bruta coletada, também promove a contaminação de importantes recursos hídricos da cidade de Rio Claro, pois descarta no Córrego Santo Antônio todos os seus efluentes brutos, portanto sem qualquer tipo de tratamento, o que é considerado, pela legislação de recursos hídricos vigentes no país, como um crime ambiental.

A avaliação realizada no presente estudo, comprova um tipo de contaminação de transferências de compostos tóxicos por via hídrica, pois a contaminação que chega ao Córrego Santo Antônio, é repassada para o Ribeirão Claro que, por ser afluente do Rio Corumbataí, também transfere a contaminação para esse rio, colocando em alerta a qualidade do abastecimento de água também da cidade de Piracicaba/SP.

No presente estudo foram observadas alterações sazonais, quanto aos resultados dos ensaios ecotoxicológicos, realizados com bioindicadores vegetais (*Lactuca sativa* e *Allium cepa*), em testes *in vivo*, e em testes *in vitro* realizados com a cultura celular HepG2/C3A, bem como pela avaliação dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos dos rios. As diferenças observadas nos diferentes períodos de coleta, trouxeram importantes informações sobre as características e sensibilidades dos rios estudados.

Nesta avaliação, foi possível constatar que o Córrego Santo Antônio é um recurso hídrico extremamente impactado por resíduos urbanos, mas também por apresentar maiores dificuldades de depuração, por se encontrar canalizado em, praticamente, todo o seu curso. Esse córrego recebe resíduos urbanos, por meio da galeria de águas pluviais, que descarrega todo o conteúdo neste córrego. Essa contaminação pode ser constatada, principalmente, pelos resultados obtidos no ponto SAS, de presença de coliformes totais

e *Escherichia coli* acima do estabelecido na legislação, como também de alterações em alguns de seus parâmetros físico-químicos, que denotam a possibilidade de haver descarte irregular de resíduo, como aumento do pH, condutividade, sólidos totais dissolvidos, salinidade, nitrogênio total, DBO e DQO. Além disso, foi detectado um potencial genotóxico no ponto SAS pelo ensaio do Micronúcleo com Bloqueio de Citocinese com as células HepG2/C3A. Esse mesmo córrego também está sendo impactado pelo efluente da ETA, observado principalmente pelos resultados obtidos para os parâmetros físico-químicos (condutividade, oxigênio dissolvido, turbidez, salinidade, nitrogênio total, DBO e DQO), bem como pela presença de coliformes totais e *E. coli* acima do estabelecido na legislação para o SAE, nas três coletas realizadas. Portanto, recomenda-se que a ETA trate o seu efluente, antes do mesmo ser descartado na galeria de água pluvial, para não alterar as características hídricas do Córrego Santo Antônio.

Com relação ao Ribeirão Claro, foram observadas algumas alterações nos parâmetros físico-químicos (pH, condutividade, oxigênio dissolvido, nitrogênio total, DBO e DQO), bem como uma maior presença de coliformes totais e *E. coli*, nesses rios, que fora dos parâmetros estabelecidos na legislação vigente. Pelos resultados observados, os efluentes da ETA não estão influenciando, de maneira drástica, a qualidade físico-química, microbiológica ou representam potencial tóxico para as águas do Ribeirão Claro.

A água de abastecimento público, oferecida pela ETA à população, não se encontra dentro dos padrões físicos e químicos pré-estabelecidos pela legislação vigente, com exceção de alguns parâmetros analisados com amostra do período chuvoso. Portanto, com relação as características físico-químicas e microbiológicas da água de abastecimento, pode-se afirmar que o processo de tratamento adotado pela ETA não é eficiente. Pelos ensaios com o *Allium cepa* e com cultura de células HepG2/C3A (Ensaio do Micronúcleo com Bloqueio de Citocinese e o Ensaio do Cometa) constatou-se um potencial genotóxico da água de abastecimento público devido, provavelmente, aos efeitos dos subprodutos da desinfecção por cloro. Além disso, no caso da água de abastecimento público ser utilizada em experimentos de avaliação toxicológica, como nos ensaios de CN, é recomendado a sua substituição por água de comprovada ausência de contaminantes.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

ABBAS, A. et al. What you extract is what you see : Optimising the preparation of water and wastewater samples for in vitro bioassays. **Water Research**, v. 152, p. 47–60, 2019.

ABDA, A. et al. Mutagenicity and genotoxicity of drinking water in Guelma region, Algeria. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 187, n. 2, 2015.

ACHON, C. L.; BARROSO, M. M.; CODERIRO, J. S. Leito de drenagem: sistema natural para a redução de volume de lodo de estação de tratamento de água. **Engenahria Snitaria e Ambiental**, v. 13, n. 1, p. 54–62, 2008.

ACHON, C. L. **Ecoeficiência de sistemas de tratamento de água à luz dos conceitos da iso 14.001**. 2008. 227f. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento) - São Carlos: Universidade de São Paulo, 2008.

AFANASIEVA, K.; SIVOLOB, A. Physical principles and new applications of comet assay. **Biophysical Chemistry**, v. 238, p. 1–7, jul. 2018.

AGUILHEIRA-PORTILLO, G. et al. Rat brain slices: an optimum biological preparation for acute neurotoxicological studies. In: ASCHNER, M.; COSTA, L. (Eds.). . **Cell Culture Techniques**. 2. ed. New York, U.S.A: Springer Science & Business Media, 2019. p. 195–207.

AKHTAR, M. F. et al. Toxicity Appraisal of Untreated Dyeing Industry Wastewater Based on Chemical Characterization and Short Term Bioassays. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 96, p. 502–507, 2016.

ANA, AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS; CETESB, COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Guia nacional de coleta e preservação de amostras - água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidos**. Brasília. 2011.

ANDREOLI, C. V. **Resíduos Sólidos do Saneamento: Processamento, Reciclagem e Disposição Final**. 1. ed. Curitiba, PR: RiMa, ABES, 2001.

ARAÚJO, F. C. et al. Caracterização física do resíduo de uma estação de tratamento de água para sua utilização em materiais de construção. **Cerâmica**, v. 61, p. 450–456, 2015.

ARESPCJ, AGÊNCIA REGULADORA DOS SERVIÇOS DE SANEAMENTO DAS BACIAS

DOS RIOS PIRACICABA - CAPIVARI E JUNDIAÍ. **Relatório de Fiscalização Técnica dos Sistemas de Água e Esgoto do Município de Rio ClaroRelatórios de Fiscalização**AmericanaARESPCJ, , 2015. Disponível em: <http://www.arespcj.com.br/arquivos/12/relatorios-de-fiscalizacao.aspx>

ARESPCJ, AGÊNCIA REGULADORA DOS SERVIÇOS DE SANEAMENTO DAS BACIAS DOS RIOS PIRACICABA - CAPIVARI E JUNDIAÍ. **Relatório de Fiscalização Técnica dos Sistema de Abastecimento de Água do Município de Rio Claro**AmericanaARESPCJ, , 2018. Disponível em: <http://www.arespcj.com.br/arquivos/12/relatorios-de-fiscalizacao.aspx>

BATISTA, I. F. et al. Potencial contribuição do lodo da estação de tratamento de água (ETA) para a poluição de rios. **Scientia Plena**, v. 17, n. 10, 2021.

BERRIDGE, M. V.; HERST, P. M.; TAN, A. S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. **Biotechnology Annual Review**, v. 11, p. 127–152, 2005.

BIANCHI, J.; ESPINDOLA, E. L. G.; MARIN-MORALES, M. A. Genotoxicity and mutagenicity of water samples from the Monjolinho River (Brazil) after receiving untreated effluents. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 4, p. 826–833, 2011.

BIANCHI, E. et al. Monitoring the Genotoxic and Cytotoxic Potential and the Presence of Pesticides and Hydrocarbons in Water of the Sinos River Basin, Southern Brazil. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 72, p. 321–334, 2016.

BOELEE, E. et al. Water and health: From environmental pressures to integrated responses. **Acta Tropica**, v. 193, n. March, p. 217–226, maio 2019.

BRASIL. **Lei nº 9605 - Dispõe sobre as sanções penais e administrativas derivadas de condutas e atividades lesivas ao meio ambiente, e dá outras providências**, 1998. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l9605.htm>. Acesso em: 7 set. 2021.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Portaria de Consolidação nº 5 de 2017 - Consolidação das normas sobre as ações e os serviços de saúde do Sistema Único de Saúde**Brasil, 2017. Disponível em:

<https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/marco/29/PRC-5-Portaria-de-Consolida----o-n---5--de-28-de-setembro-de-2017.pdf>. Acesso em: 15 set. 2021

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Portaria GM/MM nº 888 de 2021 - Altera o Anexo XX da Portaria de Consolidação GM/MS nº 5 de 28 de setembro de 2017, para dispor sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para o consumo humano e seu perdão de potabilidade**, 2021. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/portaria-gm/ms-n-888-de-4-de-maio-de-2021-318461562>. Acesso em: 18 set. 2021

BRASIL, MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Resolução do CONAMA 357 - 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**Brasil, 2005. Disponível em: <https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Resolucao/2005/res_conama_357_2005_classificacao_corpos_agua_rtfcda_altrd_res_393_2007_397_2008_410_2009_430_2011.pdf>. Acesso em: 7 set. 2021

BRASIL, MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Resolução do CONAMA 430 - Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução no 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA.**Brasil, 2011. Disponível em: <http://conama.mma.gov.br/?option=com_sisconama&task=arquivo.download&id=627>. Acesso em: 10 set. 2021

BRATBY, J. **Coagulation and Flocculation in Water and Wastewater Treatment**. 3ª ed. Londres: IWA Publishing, 2016.

CARITÁ, R.; MARIN-MORALES, M. A. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. **Chemosphere**, v. 72, n. 5, p. 722–725, 2008.

CLARK, S. C. **Operation guide to AWWA Standard G100: water treatment plant operation and management**. Denver: Association, American Water Works, 2011.

COLLINS, A. R. The comet assay for DNA damage and repair: Principles, applications, and limitations. **Applied Biochemistry and Biotechnology - Part B Molecular**

Biotechnology, v. 26, n. 3, p. 249–261, 2004.

COLLIVIGNARELLI, M. C. et al. Overview of the main disinfection processes for wastewater and drinking water treatment plants. **Sustainability (Switzerland)**, v. 10, n. 1, p. 1–21, 2018.

COLTMAN, N. J. et al. Application of HepG2/C3A liver spheroids as a model system for genotoxicity studies. **Toxicology Letters**, v. 345, p. 34–45, 2021.

CONTIJO, Á. M. DE M. C.; TICE, R. Teste do cometa para a detecção de danos no DNA e reparo em células individualizadas. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Eds.). **Mutagênese Ambiental**. Canoa: Editora da ULBRA, p. 247–279.

CORROQUÉ, N. A. **Avaliação toxicogenéticia de amostras ambientais de uma área de mineração de ouro (Paracatu-MG) contaminada com arsênio e outros metais)**. 2019. 150f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Biologia Celular e Molecular)—Rio Claro, SP: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2019.

CRITTENDEN, J. C. et al. **MWH’s Water Treatment Principle and Design**. 3. ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2012.

CUNHA, M. V. P. DE O. **Importância da frequência de descarte de lodo na eficiência dos decantadores de estações de trataemnto de água em ciclo completo**. 2004. 261f. Dissertação (Mestre em Engenharia Civil)—Belém: Universidade Federal do Pará, 261f., 2004.

CZENAVE, J.; AMÉ, M. V.; MENONE, M. L. Biomarcadores de Contaminación. In: CARRIQUIRIBORDE, P. (Ed.). . **Principios de Ecotoxicología**. 1ª ed. La Plata: Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP), 2021. p. 342.

DAAE, D. A. DE Á. E E. DE R. **Sistema de Tratamento da Água**. Disponível em: <https://daaerioclaro.sp.gov.br/sistema-de-tratamento-da-agua/>. Acesso em: 10 jan. 2022.

DE CASTRO, F. J. **Avaliação ecotoxicológica dos percolados das colunas de cinza de carvão e de solos com cinza de carvão utilizando *Lactuca sativa* e *Daphnia similis* como organismos teste**. 2013. 106f. Dissertação (Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear)—São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, 106f.

2013.

DE PÁDUA, V. L. Introdução ao tratamento de água. In: HELLE, L.; DE PÁDUA, V. L. (Eds.). **Abastecimento de água para o consumo humano**. 2. ed. Belo Horizonte: Editora UFMG, 2010. p. 531–583.

DEUTSCHMANN, B. et al. Lomgitudinal profile of the genotoxic potential of the River Danube on erythrocytes of wild common bleak (Albumus albumus) assessed using the comet and micronucleus assay. **Science of the Total Environment**, v. 573, p. 1441–1449, 2016.

DIAS, C. G.; LIBRANTZ, A. F. H.; DOS SANTOS, F. C. R. Modelagem e simulação de um ssitema inteligente para controle de dosagem da pós-cloração em estações de tratamento de água. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 25, n. 2, p. 323–332, 2020.

DÖRR, F. et al. Ecotoxicologia. In: OGA, S.; CAMARGO, M. M. DE A.; BATISTUZZO, J. A. DE O. (Eds.). . **Fundamento da Toxicologia**. 4. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2014. p. 135–147.

EPA, UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Seedling emergence and seedling growth**, 2012.

FARIA, M. L. C. DE et al. Potencial de citotoxicidade e mutagenicidade das águas do Rio Jaru, Estado de Rondônia, em células de *Allium cepa*. **Gaia Scientia**, v. 11, n. 2, p. 104–114, 2017.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 455, n. 1–2, p. 81–95, 2000.

FENECH, M.; CROTT, J. W. Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes - Evidence for breakage-fusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 504, n. 1–2, p. 131–136, 2002.

FENECH, M. et al. HUMN project: Detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 534, n. 1–2, p. 65–75, 2003.

FISKESJÖ, G. The Allium test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, n. 1, p. 99–112, 1985.

FJÄLLBORG, B. et al. Toxicity identification evaluation of five metals performed with two organisms (*Daphnia magna* and *Lactuca sativa*). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 50, n. 2, p. 196–204, 2006.

FREITAS, C. M. O. DE et al. Teores de flúor em mananciais e na rede de abastecimento público de municípios de Pernambuco, Brasil. **Ciências & Saúde Coletiva**, v. 26, n. 2, p. 3647–3656, 2021.

GADZAŁA-KOPCIUCH, R. et al. Some Considerations About Bioindicators in Environmental Monitoring. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 13, n. 5, p. 453–462, 2004.

GILCA, A. F. et al. Emerging disinfection byproducts : A review on their occurrence and control in drinking water treatment processes. **Chemosphere**, v. 259, p. 127476, 2020.

GOMES, L. DA S. **Redes neurais artificiais aplicadas à inferência dos sinais de controle de dosagem de coagulantes em uma estação de tratamneto de água por filtração rápida**. 2012. 97f. Dissertação (Mestre em Engenharia Elétrica)—Fortaleza: Universidade Federam do Ceará, 97f. 2012.

GUO, L. et al. Similarities and Differences in the Expression of Drug-Metabolizing Enzymes between Human Hepatic Cell Lines and Primary Human Hepatocytes. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 39, n. 3, p. 528–538, 2011.

HAN, Y. et al. Evaluatiion of genotoxic effects of surface waters using a baterry of bioassays indicating diferrent mode of action. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 133, p. 448–456, 2016.

HARA, R. V.; MARIN-MORALES, M. A. In vitro and in vivo investigation of the genotoxic potencial of waters from rivers under the influence of a petroleum refinery (São Paulo - State - Brazil). **Chemosphere**, v. 174, p. 321–330, 2017.

HARIRI, M. et al. In situ assessment of Karaj River genotoxic impact with the alkaline comet assay and micronucleus test, on feral brown trout (Salmo trutta fario). **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 58, p. 59–69, 2018.

HE, W.; NAN, J. Study on the impact of particle size distribution on turbidity in water. **Desalination and Water Treatment**, v. 41, n. 1–3, p. 26–34, 2012.

HEMACHANDRA, C. K.; PATHIRATNE, A. Combination of physico-chemical analysis, *Allium cepa* test system and Oreochromis niloticus erythrocyte based comet assay/nuclear abnormalities tests for cyto-genotoxicity assessments of treated effluents discharged from textile industries. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 131, p. 54–64, 2016.

HOW, Z. T. et al. Organic chloramines in chlorine-based disinfected water systems: A critical review. **Journal of Environmental Sciences (China)**, v. 58, p. 2–18, 2017.

JAGTAP, S. et al. Fluoride in Drinking Water and Defluoridation of Water. **Chemical Reviews**, v. 112, n. 4, p. 2454–2466, 2012.

JARVIS, P. et al. Comparison of coagulation performance and floc properties using a novel zirconium coagulant against traditional ferric and alum coagulants. **Water Research**, v. 46, n. 13, p. 4179–4187, 2012.

JIN, Y. **Use of a high resolution photographic technique for studying coagulation/flocculation in water treatment**. 2005. 139f. Dissertação (Mestre em Ciências)—Saskatoon: University of Saskatchewan, 139f. 2005.

JOHNSON, P. N.; AMIRTHARAJAH, A. Ferric chloride and alum as single and dual coagulants. **American Water Works Association**, v. 75, n. 5, p. 232–239, 1983.

JOHNSTON, N. R.; STROBEL, S. A. Principles of fluoride toxicity and the cellular response: a review. **Archives of Toxicology**, v. 94, n. 4, p. 1051–1069, 2020.

KASHYAP, S. J.; SANKANNAVAR, R.; MADHU, G. M. Fluoride sources, toxicity and fluorosis management techniques – A brief review. **Journal of Hazardous Materials Letters**, v. 2, p. 100033, 2021.

LAUGHINGHOUSE, H. D. et al. Biomonitoring genotoxicity and cytotoxicity of Microcystis aeruginosa (Chroococcales, Cyanobacteria) using the *Allium cepa* test. **Science of the Total Environment**, v. 432, p. 180–188, 2012.

LEME, D. M. et al. Cytotoxicity of water-soluble fraction from biodiesel and its diesel blends to human cell lines. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 8, p. 2148–2155,

2011.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 682, n. 1, p. 71–81, 2009.

LÉO, P. et al. Células Animais: conceitos básicos. In: MORAES, Â. M.; AUGUSTO, E. F. P.; CASTILHO, L. R. (Eds.). **Tecnologia do Cultivo de Células Animais de Biofármacos a Terapia Gênica**. São Paulo: Editora Roca, 2014. p. 15–41.

LIBÂNIO, M. **Fundamentos de Qualidade e Tratamento de Água**. 3ª ed. Campinas, São Paulo: Editora Átomo, 2010.

LI, L.; ZHENG, B.; LIU, L. Biomonitoring and bioindicators used for river ecosystems: Definitions, approaches and trends. **Procedia Environmental Sciences**, v. 2, p. 1510–1524, 2010.

LIU, J. et al. Toxicology in vitro Polychlorinated biphenyl quinone metabolites lead to oxidative stress in HepG2 cells and the protective role of dihydrolipoic acid. **Toxicology in Vitro**, v. 26, n. 6, p. 841–848, 2012.

LUSTOSA, J. B. et al. Tratamento e aproveitamento de água de lavagem de filtro em estação de tratamento de água. **Revista DAE**, v. 65, n. 206, p. 44–61, 2017.

LYU, J. et al. Testing the toxicity of metals, phenol, effluents, and receiving waters by root elongation in *Lactuca sativa* L. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 149, n. November 2017, p. 225–232, 2018.

MA, M. et al. Effects and mechanisms of pre-chlorination on Microcystis aeruginosa removal by alum coagulation: Significance of the released intracellular organic matter. **Separation and Purification Technology**, v. 86, p. 19–25, 2012.

MANTOVANI, M. S. et al. Teste de Microcnúcleos: in vitro e in vivo. In: SALVADORI, D. M. F. et al. (Eds.). **Da Toxicogenética a Toxicogenômica**. 1. ed. Rio de Janeiro: Atena Editora, 2021. p. 139–168.

MANZANO, B. C. **Avaliação dos potenciais citotóxico, gemotóxico e mutagênico das águas do Ribeirão Tatu, Região de Limeira/SP, após o recebimento de efluentes**

urbanos. 2010. 124f. Dissertação (Mestre em Ciências Biológicas - Biologia Celular e Molecular)—Rio Claro, SP: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 124f. 2010.

MANZANO, B. C. et al. Evaluation of the genotoxicity of waters impacted by domestic and industrial effluents of a highly industrialized region of São Paulo State, Brazil, by the comet assay in HTC cells. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 2, p. 1399–1407, 2015.

MATSUMOTO, S. T. et al. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents , as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish Oreochromis niloticus and chromosome aberrations in onion root-tips. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 1, p. 148–158, 2006.

MENDES, S. A. **Avaliação da toxicidade dos Rios do Campo e KM 119 no município de Campo Mourão-PR, sob influência de atividades antrópicas**. 2019. 92f. Dissertação (Mestre em Inovações Tecnológicas)—Campo Mourão - PR: Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 92f. 2019.

MOIMAZ, S. A. S. et al. Health surveillance: public water supply fluoridation in 40 municipalities of São paulo, Brazil. **Ciência e Saude Coletiva**, v. 25, n. 7, p. 2653–2662, 2020.

MONTEIRO, S. N. et al. Incorporation of sludge waste from water treatment plant into red ceramic. **Construction and Building Materials**, v. 22, n. 6, p. 1281–1287, jun. 2008.

MORAIS, C. R. et al. Assessment of water quality and genotoxic impact by toxic metals in Geophagus brasiliensis. **Chemosphere**, v. 152, p. 328–334, 2016.

MORAIS, D. et al. Ecotoxicology and Environmental Safety Cytotoxicity of water-soluble fraction from biodiesel and its diesel blends to human cell lines. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 8, p. 2148–2155, 2011.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, dez. 1983.

OECD, ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT.

OECD Guidelines for the testing of chemicals - Terrestrial plant teste: seeding emergence and seedling griwth test, 2006.

OECD, ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. **OECD Guideline for the testing of chemicals - In vivo Mammalian Alkaline Comet Assay**, 2016a.

OECD, ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. **OECD Guideline for the testing of chemicals - In vitro Mammalian Cell Micronucleus Test**, 2016b.

PARK, J. et al. The sensitivity of an hydroponic lettuce root elongation bioassay to metals, phenol and wastewaters. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 126, p. 147–153, 2016.

PAULI, J. G. **Influência da ação combinada do movimento inercial e da sedimentação diferencial no tamanho dos agregados na floculação e sedimentação**. 2020. 70f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil e Ambiental)—Bauru: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2020.

PELLEGRI, V.; GORBI, G.; BUSCHINI, A. Damage detection by Comet Assay on Daphinia magna: Application in freshwater biomonitoring. **Science of the Total Environment**, v. 705, 2020.

PEREIRA, I. F. M. **Genotoxicidade como parametro de monitoramento ambiental do Rio São Francisco no Polo Petrolina (PE) / Juazeiro (BA)**. 2017. 88f. Dissertação (Mestre em Genética)—Recife, Pernambuco: Universidade Federal de Pernambuco, 88f. 2017.

PHILIPPEOS, C. et al. Introduction to Cell Culture. In: MITRY, R. R.; HUGHES, R. D. (Eds.). **Human Cell Culture Protocols Methods in Molecular Biology**. 3. ed. [s.l.] Springer Science & Business Media, 2011. p. 1–13.

PILLON, A. et al. Binding of Estrogenic Compounds to Recombinant Estrogen Receptor-α : Application to Environmental Analysis. **Environmental Health Perspectives**, v. 113, n. 3, p. 278–285, 2005.

PIZZO, G. et al. Community water fluoridation and caries prevention : a critical review.

Clinical Oral Investigations, v. 11, n. June 2006, p. 189–193, 2007.

PORTAL SIGRH, SISTEMA INTEGRADO DE GERENCIAMENTO DE RECURSOS HÍDRICOS DO ESTADO DE SÃO PUALO. **Identificação dos Municípios por UGRHI/CBH**. Disponível em: <https://sigrh.sp.gov.br/municipios>. Acesso em: 6 jun. 2022.

PRIAC, A.; BADOT, P. M.; CRINI, G. Évaluation de la phytotoxicité d'eaux de rejets via *Lactuca sativa* : paramètres des tests de germination et d'élongation. **Comptes Rendus - Biologies**, v. 340, n. 3, p. 188–194, 2017.

QI, J. et al. Prechlorination of algae-laden water: The effects of transportation time on cell integrity, algal organic matter release, and chlorinated disinfection byproduct formation. **Water Research**, v. 102, p. 221–228, 2016.

RAMIRES, I.; BUZALAF, M. A. R. A fluoretação da água de abastecimento público e seus benefícios no controle da cárie dentária - cinquenta anos no Brasil. **Ciências & Saúde Coletiva**, v. 12, n. 4, p. 1057–1065, 2007.

REALI, M. A. P.; PAZ, L. P. S.; DANIEL, L. A. Tratamento de água para o consumo humano. In: CALIJURI, M. DO C.; CUNHA, D. G. F. (Eds.). **Engenharia Ambiental: Conceitos, Tecnologia e Gestão**. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda., 2013. p. 402–453.

REIS, E. L. T. DOS et al. Identificação da influência do descarte de lodo de estações de tratamento de água. **Quimica Nova**, v. 30, n. 4, p. 865–872, 2007.

RENAULT, F. et al. Chitosan for coagulation/flocculation processes - An eco-friendly approach. **European Polymer Journal**, v. 45, n. 5, p. 1337–1348, 2009.

RIBEIRO, D. L.; BARCELOS, G. R. M.; D'ARCE, L. P. G. Genotoxic effects of water from São Francisco River, Brasil, in Astyanax paranae. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 93, p. 274–279, 2014.

RICHTER, C. A. Sedimentação e Decantação. In: HEMFIBRA, T. EM S. (Ed.). **Água: Métodos e Tecnologia de Tratamento**. São Paulo: Editora Blucher, 2009. p. 159–218.

ROSARIO, C. G. A. **Avaliação da disposição de lodo gerado nume estação de tratamento de água em reator anaeróbio de fluxo ascendente e manto de lodo**

(UASB). 2007. 116f. Dissertação (Mestre em Engenharia)—São Paulo: Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, 116f, 2007.

SADIQ, R.; RODRIGUEZ, M. J. Disinfection by-products (DBPs) in drinking water and predictive models for their occurrence: A review. **Science of the Total Environment**, v. 321, n. 1–3, p. 21–46, 2004.

SANTOS, R. A. DOS et al. Ensaio do Cometa. In: SALVADORI, D. M. F. et al. (Eds.). . **Da Toxicogenética a Toxicogenômica**. 1. ed. Rio de Janeiro: Editora Atheneu, 2021. p. 117–145.

SARITHA, V.; SRINIVAS, N.; VUPPALA, N. V. S. Analysis and optimization of coagulation and flocculation process. **Applied Water Science**, v. 7, n. 1, p. 451–460, 2017.

SILVA, C. A. DA et al. Classificação dos lodos formados durante o processo de coagulação/floculação da água com os coagulantes PAC e Moring Oleifera. **Engevista**, v. 14, n. 3, p. 302–309, 2012.

SILVA, G. H. DA et al. Mutagenicidade e genotoxicidade em águas superficiais e subterrâneas antes e após o tratamento da água. **HOLOS Environment**, v. 13, n. 1, p. 64–73, 2013.

SILVA, B. R. B. DA. **Avaliação da genotoxicidade como parâmetro de monitoramento ambiental do Rio Ipojuca - Caruaru (PE)**. 2019. 71f. Dissertação (Mestre em Ciências Biológicas)—Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 71f, 2019.

SILVA, M. T. P. **Avaliação dos efeitos tóxicos e genotéticos de microcistinas sob sistemas testes animais e vegetais**. 2017. 140f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Biologia Celular e Molecular)—Rio Claro, SP: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2017.

SILVEIRA, G. L. et al. Toxic effects of environmental pollutants : Comparative investigation using *Allium cepa L* . and *Lactuca sativa L* . **Chemosphere**, v. 178, p. 359–367, 2017.

SIMONYAN, A. et al. Genotoxicity of Water Contaminants from the Basin of Lake Sevan, Armenia Evaluated by the Comet Assay in Bibel Carp (*Carassius auratus gibelio*) and *Tradescantia* Bioassays. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 96, p. 309–313, 2016.

SOBRERO, M. C.; RONCO, A. Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L). In: MORALES, G. C. (Ed.). **Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas**. México: Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo, 2004. p. 71–80.

SOBRINHO, M. A. DA M. et al. Geração , tratamento e disposição final dos resíduos das estações de tratamento de água do estado de Pernambuco. **Engenhatia Sanitaria e Ambiental**, v. 24, n. 4, p. 761–771, 2019.

SONG, Y. et al. Comparative Evaluation of Aluminum Sulfate and Ferric Sulfate-Induced Coagulations as Pretreatment of Microfiltration for Treatment of Surface Water. **International Journal of Environmental Tesearch and Public Health**, v. 12, p. 6700–6709, 2015.

SOUZA, L. L. **Avaliação in vivo e in vitro do potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico da água e do sedimento do Rio Corumbataí - São Paulo, Brasil**. 2014. 123f. Dissertação (Mestre em Ciências Biológicas - Biologia Celular e Molecular)—Rio Claro: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 123f, 2014.

SOUZA, F. H. DE et al. Diagnóstico e discussão sobre uso da Filtração Lenta para abastecimento público em Santa Catarina , Brasil. **Revista DAE**, v. 66, n. 209, p. 37–50, 2018.

SOUZA, T. DA S. et al. The use of diplopods in soil ecotoxicology – A review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 103, p. 68–73, 2014.

SRIVASTAV, A. L.; PATEL, N.; CHAUDHARY, V. K. Disinfection by-products in drinking water: Occurrence, toxicity and abatement. **Environmental Pollution**, v. 267, p. 115474, 2020.

ŠTAMPAR, M. et al. Science of the Total Environment Hepatocellular carcinoma (HepG2 / C3A) cell-based 3D model for genotoxicity testing of chemicals. **Science of the Total Environment**, v. 755, 2021.

TAGHIZADEH, MOHAMMAD. Pre-Sedimentation Tank Effects on Water Treatment Unit Operation. **Environmental quality**, v. 28, n. March, p. 35–42, 2018.

TIGRE, R. C. et al. Allelopathic and bioherbicidal potential of Cladonia verticillaris on the

germination and growth of *Lactuca sativa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 84, p. 125–132, 2012.

TRINTINAGLIA, L. et al. Cytotoxicity assays as tools to assess water quality in the Sinos River basin. **Brazilian Journal of Biology**, v. 75, n. 2 suppl, p. 75–80, maio 2015.

VALENTIN-SEVERIN, I. et al. Use of HepG2 cell line for direct or indirect mutagens screening : comparative investigation between comet and micronucleus assays. **Mutation Research**, v. 536, p. 79–90, 2003.

VAN STRAALEN, N. M. Evaluation of bioindicator systems derived from soil arthropod communities. **Applied Soil Ecology**, v. 9, n. 1–3, p. 429–437, 1998.

WANG, Z. et al. Effect of the micro-flocculation stage on the flocculation/sedimentation process: The role of shear rate. **Science of the Total Environment**, v. 633, p. 1183–1191, 2018.

WATANABE, Y. Flocculation and me. **Water Research**, v. 114, p. 88–103, 2017.

WESTERINK, W. M. A. et al. The development of RAD51C, Cystatin A, p53 and Nrf2 luciferase-reporter assays in metabolically competent HepG2 cells for the assessment of mechanism-based genotoxicity and of oxidative stress in the early research phase of drug development. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 696, n. 1, p. 21–40, fev. 2010.

YOUNG, B. J. et al. Toxicity of the effluent from an anaerobic bioreactor treating cereal residues on *Lactuca sativa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 76, n. 1, p. 182–186, 2012.

YU, Y. et al. Control of disinfection byproducts in drinking water treatment plants: Insight into activated carbon filter. **Chemosphere**, v. 280, n. February, p. 130958, 2021.

ŽEGURA, B. et al. Combination of in vitro bioassays for the determination of cytotoxic and genotoxic potential of wastewater, surface water and drinking water samples. **Chemosphere**, v. 75, n. 11, p. 1453–1460, jun. 2009.

ZHANG, X. et al. Effect of hydrodynamic breakage on floc evolution and turbidity reduction in flocculation and sedimentation processes. **Water Supply**, v. 22, n. 2, p. 1409-1420,

2021.