

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA  
ÊNFASE EM ECOLOGIA

**PAULA HAUBER GAMEIRO**

**ESTUDO DA QUALIDADE AMBIENTAL DE REGIÕES COM CAPTAÇÃO  
DE ÁGUA PARA ABASTECIMENTO PÚBLICO**

Porto Alegre, 17 de dezembro de 2019

**PAULA HAUBER GAMEIRO**

**ESTUDO DA QUALIDADE AMBIENTAL DE REGIÕES COM CAPTAÇÃO  
DE ÁGUA PARA ABASTECIMENTO PÚBLICO**

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ecologia, com ênfase em Ecologia pelo Programa de Pós-Graduação em Ecologia, do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Vera Maria Ferrão Vargas**

Comissão Examinadora

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Juliana da Silva

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Kelly Cristina Tagliari de Brito

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Luciane Oliveira Crossetti

Porto Alegre, 17 de dezembro de 2019

### CIP - Catalogação na Publicação

Gameiro, Paula Hauber Gameiro  
ESTUDO DA QUALIDADE AMBIENTAL DE REGIÕES COM  
CAPTAÇÃO DE ÁGUA PARA ABASTECIMENTO PÚBLICO / Paula  
Hauber Gameiro Gameiro. -- 2019.  
121 f.  
Orientadora: Vera Maria Ferrão Vargas Vargas.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Instituto de Biociências, Programa de  
Pós-Graduação em Ecologia, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Salmonella/microsoma. 2. sedimento. 3.  
mutagênese ambiental. 4. micropoluentes emergentes. 5.  
água potável. I. Vargas, Vera Maria Ferrão Vargas,  
orient. II. Título.

**“RIO TAQUARI!**

**Observando a beleza de tuas paisagens,  
Admirei tuas várzeas multicolores,  
Ouvi o cantar sonoro de tuas ondas,  
O rugir de tuas cachoeiras borbulhantes  
E o marulho gigante de tuas enchentes!”**

(Gino Ferri, 1991)

*“Águas escuras dos rios  
Que levam a fertilidade ao sertão  
Águas que banham aldeias  
E matam a sede da população...”*

*Música Planeta Água,  
compositor Guilherme Arantes*

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Vera Maria Ferrão Vargas que há 8 anos me deu confiança e incentivo para eu realizar minha jornada científica. Sempre incansável na sua dedicação, paciência e carinho. Com certeza contribuiu muito para o meu crescimento pessoal e profissional.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) pelo curso de Pós-Graduação em Ecologia.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ecologia pelos conhecimentos científicos adquiridos.

Aos colegas e funcionários do Centro de Ecologia pelo convívio e muitos auxílios prestados.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de Doutorado cedida.

À Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luis Roessler (FEPAM).

Aos colegas do Laboratório de Mutagênese Ambiental pelo convívio, amizade e auxílio nos meus experimentos: Kauê, pelos Ensaio Ames e coletas de água, Naiara, Fernanda, Bettina, Ismael, Lívia, Fabiano (Ensaio Ames), Aline e Kewen (pelos ensaios *Allium cepa*), Catiusa (ensaio com embriões de Zebrafish) e Erick pela amizade.

Ao Prof. Heinrich Hasenack pelo auxílio na realização dos mapas, utilizando ferramentas SIG.

Ao Prof. Dr. Alexandre Arenzon por permitir minha realização dos ensaios Zebrafish no Laboratório ECOTOX.

À Dra. Clarice Torres de Lemos, pelo auxílio na realização dos ensaios citogenéticos.

À Equipe de amostragem da FEPAM, pela realização das coletas das minhas amostras de sedimento e água da primeira etapa do trabalho.

Aos funcionários da Vigilância Sanitária que me acompanharam nas amostragens dentro das estações de tratamento da CORSAN e permitiram a coleta das amostras na segunda etapa da tese. Especialmente Vanda Garibotti pela sua incansável atenção para organizar minhas coletas.

À Tatiane Cardozo e Prof. Flávio André Pavan pelas análises químicas nas amostras de água tratada da segunda etapa da tese.

À Banca de Qualificação Profa. Dra. Kelly Cristina Tagliari De Brito, Fernando Gertum Becker e Profa. Dra. Teresinha Guerra pelas contribuições fornecidas ao primeiro artigo desta tese.

À Hedy Hofmann pela tradução dos artigos.

À minha família pelo incentivo e força. Especialmente aos meus queridos pais João Luís (*in memorian*) e Mara, por não medirem esforços para me incentivarem e darem o suporte necessário para eu chegar à minha realização profissional.

Ao meu marido Tiago pelo apoio, companheirismo e paciência.

Ao meu querido filho Theo que trabalhou com a mamãe quando ainda estava na barriga e nasceu no início deste trabalho.

À minha avó Rosália, pela amizade e por estar sempre apostando no meu sucesso.

Aos meus irmãos Gustavo e Augusto, cunhadas e sobrinhos pela força e estímulo de sempre.

À Deus pela força e inspiração.

## RESUMO

A desinfecção da água é um processo de grande importância para redução de doenças veiculadas pela água contaminada. Entretanto nos últimos 40 anos pesquisadores verificaram a correlação do consumo de água tratada com efeitos à saúde, como o câncer. Já foi comprovada a formação de subprodutos de desinfecção (DBPs) durante a reação do cloro com a matéria orgânica presente no meio aquático. Recentemente tem sido relatadas a presença de compostos em concentrações muito baixas no ambiente, os micropoluentes emergentes (MEs), sendo a maioria desses ainda não regulamentada quanto à limitação de seus usos. Assim, é válido considerar que a qualidade da água tratada depende da água bruta, pois muitos contaminantes podem ser carreados até o tratamento final. MEs estão presentes na composição de fármacos, produtos de cuidados pessoais, hormônios esteróides, disruptores endócrinos, substâncias químicas industriais e pesticidas. Pesquisas anteriores na área de estudo verificaram contaminação do sedimento, em locais destinados à captação de água potável no Rio Taquari (RS), próximos a uma área em processo de remediação de solo contaminado por conservantes de madeira. Dando continuidade, o objetivo do presente estudo foi analisar a presença de contaminantes em locais de captação de água potável, definindo as fontes e os efeitos tóxicos e genotóxicos desses estressores como um parâmetro de qualidade para o ecossistema, sua influência na água tratada e possíveis reflexos para a saúde humana. Os locais de captação no rio Taquari e as estações de tratamento de água, ETAS (WTP), estudados nesta bacia foram: (Ta063 - WTP01), (Ta032 - WTP02), (Ta011 - WTP03) e (Ta006 - WTP04). Os pontos de amostragem foram nomeados de acordo com as letras iniciais do rio (Ta), seguidas pelo número de quilômetros de distância em relação à foz. Na primeira etapa (2015), foi realizada a investigação da qualidade do Rio Taquari através de análises químicas, de toxicidade, genotoxicidade e mutagênese nos sedimentos e águas em locais destinados à captação de água potável. Para definir os usos e cobertura do solo como possíveis fontes de contaminantes da bacia foram utilizadas ferramentas de sistemas de informação geográfica (SIG). Os resultados dessa etapa da pesquisa indicaram a presença de estressores citotóxicos e genotóxicos, em sedimento e em água, com prevalência de mutagênicos de ação direta. Na análise química dos estressores descritos em estudos anteriores (hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e metais pesados) observou-se pequena contribuição para explicar os danos detectados nos atuais ensaios de genotoxicidade. As respostas do ensaio

*Salmonella*/microssoma indicaram que o local Ta032 teve a maior potência mutagênica em extratos orgânicos de sedimentos, enquanto o Ta063 em extratos de água. Análises no teste de *Allium cepa*, aplicado aos sedimentos *in natura*, mostraram indução significativa de micronúcleos em Ta032. Entretanto, bioensaios com embriões de *Danio reio* (FET), nas amostras de água superficial, não detectaram respostas significativas. Este conjunto de resultados gerou alerta quanto à natureza da mistura complexa presente nos locais de captação de água potável, somadas às evidências definidas pelas análises de SIG quanto ao predomínio de atividades relacionadas à agricultura. Além disso, em Ta063 foram encontradas atividades industriais de médio a alto potencial poluidor próximas. Na segunda etapa de trabalho (2017) foi investigada a água antes (bruta) e após o tratamento (tratada) para verificar a influência da carga orgânica presente nesse manancial na geração de subprodutos perigosos durante o processo de cloração. As coletas foram realizadas no interior das estações de tratamento. Os resultados mostraram que a água bruta teve uma menor contaminação em relação à primeira etapa do estudo, sendo a mutagênese encontrada apenas na WTP03, com e sem ativação metabólica (S9). Nas amostras de água tratada foram encontrados resultados significativos para as duas linhagens de *Salmonella*, sendo a TA100 mais sensível em ensaios diretos. O local com maior potência mutagênica foi WTP04, seguido de WTP02, WTP01 e WTP03. Dados de amostragem realizada anteriormente no local WTP04 (2015), incluídos neste estudo, mostraram que compostos mutagênicos na água tratada deste local já estavam presentes. Alguns resultados observados na água bruta e tratada apresentaram padrões diferentes de mutagênese esperada em consequência da formação de DBPs e detectadas pelo ensaio *Salmonella* como relatado na literatura, gerando preocupação quanto à origem de contaminantes presentes nestas amostras. As análises químicas indicaram que o local WTP04 foi o que apresentou maiores teores de MEs totais, sendo a atrazina, paracetamol e ácido salicílico, os predominantes. Nos demais locais também foram encontrados MEs, sendo o WTP02 com menor valor total na água tratada, representando uma redução de 45,3% de MEs comparados com a bruta. Embora os resultados da água bruta do segundo trabalho tenham apresentado menor potencial mutagênico, a presença de MEs e as respostas de mutagênese nas amostras da primeira etapa, indicaram que estão sendo carregados contaminantes para o rio, sejam por esgoto doméstico, atividades agrícolas ou industriais e depositados no sedimento. Os resultados de MEs mostraram que, embora apresentem redução nas águas tratadas em relação às brutas, ainda estiveram presentes após tratamento. Além disso, a maioria dos MEs, com exceção da



atrazina, não contribuíram na mutagênese detectada pelo ensaio *Salmonella*, já que as amostras brutas foram quase todas negativas. Entretanto, após tratamento, a mutagênese foi encontrada em todas as ETAS, podendo os MEs também estarem reagindo com o cloro, contribuindo na formação de DBPs mutagênicos com padrão diferente do esperado, após o tratamento convencional. Assim, é necessário reforçar um alerta quanto à presença de substâncias perigosas nos locais de estudo, possivelmente distribuídas para a população; a necessidade de controle, fiscalização e estabelecimento de melhores padrões para a preservação da vida aquática, conservação dos mananciais e potabilidade da água distribuída à população.

**Palavras-chave:** *Salmonella*/microssoma; sedimento; extratos orgânicos; micropoluentes emergentes, DBPs; ensaios citogenéticos; *Danio rerio*, *Allium cepa*.

## ABSTRACT

Water disinfection is an important process to reduce diseases transmitted by contaminated water. However, in the last 40 years, researchers have found a correlation between the consumption of treated water with effects on health, such as cancer. The formation of disinfection byproducts (DBPs) during the reaction between chlorine and the organic matter present in the aquatic ecosystem has already been proved. Recently, compounds have been found at very low concentrations in the environment, the emerging micropollutants (EMs), and most of them have not yet been regulated to limit their uses. Thus, it is valid to consider that the quality of treated water depends on the raw water, since many contaminants may be carried to the final treatment. EMs are present in the composition of drugs, personal care products, steroid hormones, endocrine disruptors, industrial chemical substance and pesticides. Previous research in the area of study found sediment contamination at sites to be used to abstract drinking water from the Taquari River (Brazil/RS), close to an area which is undergoing a process of remediation of soil contaminated by wood conservants. The objective of the present study was to analyze the presence of contaminants at sites where drinking water is abstracted, defining the sources and toxic and genotoxic effects of these stressors as a parameter of quality for the ecosystem, their influence on treated water and possible reflexes for human health. The Taquari River abstraction sites and water treatment plants (WTP) studied in this basin were: (Ta063 - WTP01), (Ta032 - WTP02), (Ta011 - WTP03) and (Ta006 - WTP04). The sampling points were named according to the initial letters of the river (Ta), followed by the number of kilometers away from the mouth. In a first stage (2017), the quality of Taquari River was investigated through chemical analyses and toxicity, genotoxicity and mutagenesis in the sediments and water at sites used for the abstraction of drinking water. To define the uses and soil cover as possible sources of contaminants in the basin, geographic information systems (GIS) tools were used. The results of this stage of research indicated the presence of cytotoxic and genotoxic stressors in sediment and in water, with the prevalence of direct action mutagenics. In the chemical analysis of the stressors described in previous studies (polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals), a small contribution was observed to explain the damages detected in the current genotoxicity assays. The responses of the *Salmonella*/microsome assay indicated that site Ta032 had the greatest mutagenic potency in organic extracts of sediments, while for Ta063 it was in extracts

of water. Analyses in the *Allium cepa* test applied to *in natura* sediments showed a significant induction of micronuclei at Ta032. However, bioassays with *Danio rerio* embryos (FET) in the samples of surface water did not detect significant responses. This set of results generated an alert regarding the nature of the complex mixture present at the drinking water abstraction sites, summing up the evidence defined by the GIS analyses as to the predominance of agricultural activities. Besides, at Ta063 industrial activities with a medium to high potential for pollution were found close by. In the second stage of the study (2015), water was investigated before (raw) and after treatment (treated) to look at the influence of the organic load present in this source on the generation of hazardous byproducts during the chlorination process. The samplings were performed in the treatment plants. The results showed that the raw water had less contamination compared to the first stage of the study, and mutagenesis was found only in WTP03, with and without S9. In the samples of treated water significant results were found for the two strains, TA100 being the most sensitive in direct assays. The site with the greatest mutagenic potency was WTP04, followed by WTP02, WTP01 and WTP03. Data of a sampling performed previously at site WTP04 (2015) included in this study showed that the mutagenic compounds in the water treated from this site were already present. Some results observed in the raw and treated water presented different patterns of mutagenesis expected mutagenesis as a result of DBPs formation and detected by the *Salmonella* assay as reported in the literature, causing concern regarding the origin of contaminants present in these samples. The chemical analyses indicated that site WTP04 presented the highest total EM contents, the predominant ones being atrazine, paracetamol and salicylic acid. At the other sites, EMs were also found, WTP02 being the one with the lowest total value in the treated water, representing a 45.3% reduction of EMs compared to the raw one. Although the results of raw water in the second study had less mutagenic potential, the presence of EMs and the mutagenesis responses in the samples of the first stage indicated that contaminants are being carried into the river, be it by domestic sewage, agricultural or industrial activities, and deposited in the sediment. The results of EMs showed that, although they present a reduction in the treated waters compared to the raw ones, they were still present after treatment. Moreover, most of the EMs, except for atrazine, did not contribute to the mutagenesis detected by the *Salmonella* assay, since the raw samples were almost all negative. However, after treatment, mutagenesis was found at all Water Treatment Plants (WTPs), and the EMs may also be reacting with the chlorine, contributing to the

formation of mutagenic DBPs with a different standard from that expected after conventional treatment. Therefore it is necessary to reinforce an alert regarding: the presence of hazardous substances in the areas of study, possibly distributed to the population; the need to control, inspect and establish better standards to preserve aquatic life, conserve the sources and potability of the water distributed to the population.

**Key-words:** *Salmonella*/microsome; sediment; organic extracts; emerging micropollutants, DBPs; cytogenetic assays; *Danio rerio*, *Allium cepa*.

## LISTA DE ABREVIACÕES

2AF - 2aminofluoreno

4NQO - 4oxidonitroquinolina

ANA - Agência Nacional de Águas

ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry

AZS - azida sódica

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CCA – Arseniato de cobre cromado

CCME - Canadian Council of Ministers of the Environment

CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente

DBPs – Disinfection by-products (Subprodutos de desinfecção)

DCM - diclorometano

DMSO - dimetilsulfóxido

ETA – Estação de Tratamento de Águas

ETARs - Estações de Tratamento de Águas Residuais

ETE - Estações de Tratamento de Esgoto

FEPAM - Fundação Estadual de Proteção Ambiental Luis Henrique Roessler

FET - Fish Embryo Toxicity

HAAs - Ácidos Haloacéticos

HNMs - Halonitrometanos

HPA/PHA – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos

IARC – Agência de Pesquisa sobre o Câncer

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ISQG - Interim Sediment Quality Guidelines

ME - Micropoluentes Emergentes

MN - Micronúcleo

MX - Mutagênico X (Halofuranonas)

MOE/EOM – Massa orgânica extraída

NDMA - N-nitrosodimetilamina

OMS – Organização Mundial da Saúde

ONU - Organização das Nações Unidas

PEL - Probable Effect Level

PCP - Pentaclorofenol

S9 - Fração de Metabolização

US EPA – Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos

TEL – Threshold Effect Level

TRI - Inventário de Emissões Tóxicas

THMs - Trihalometanos

WHO – World Health Organization

WTP - Water Treatment Plant

## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO

**Figura 1.** Localização das quatro cidades estudadas que utiliza o Rio Taquari como fonte de água potável e seus pontos de captação .....28

### ARTIGO 1 - Evaluation of effect of hazardous contaminants in areas for the abstraction of drinking water

**Figure 1.** Study area located in the lower part of the Taquari River and sampling sites in front of the abstraction pump for water supply. The sites were named using the initial letters of the river (Ta).....39

**Figure 2.** Delimitation of the areas according to the drainage of the relief in relation to a sampling site, A = DLA063; B = DLA032; C = DLA011 and D = DLA006. DLA = Delimited area and the numbers show the distance from the mouth in kilometers.....49

**Figure A.1.** Land use and cover in the areas delimited at the sampling sites in front of the public water supply abstraction pump.....71

### ARTIGO 2 - Influência de compostos mutagênicos na água potável de quatro cidades do Rio Grande do Sul, Brasil

**Figura 1.** Localização dos locais de amostragem para a pesquisa de mutagenicidade em água bruta e tratada de quatro cidades do Vale do Taquari. Ta (letras iniciais do Rio Taquari seguido da sua quilometragem de distância em relação a foz); WTP (water treatment plant sites - ETAs) .....82

**Figura 2.** Comparação da sensibilidade das linhagens de *Salmonella* de acordo com a concentração mutagênica efetiva (CME em L) e a Potência Mutagênica (PM em rev / L) de amostras de água de abastecimento na ausência (-S9) e presença (+ S9) de ativação metabólica.....90

## LISTA DE TABELAS

### INTRODUÇÃO

<b>Tabela 1.</b> Descrição dos pontos de amostragem, em área de captação de água potável.....	27
---	----

### ARTIGO 1 - Evaluation of effect of hazardous contaminants in areas for the abstraction of drinking water

<b>Table 1.</b> Mutagenic and cytotoxic responses of organic sediment extracts (revertants/g equivalents of dry sediment) in the presence and absence of S9 of rat at the sampling sites of Taquari River in the four municipalities investigated .....	51
<b>Table 2.</b> Toxicity, cytotoxicity and genotoxicity of sediment samples from the Taquari River in areas from the abstraction of drinking water in the <i>Allium cepa</i> test.....	52
<b>Table 3.</b> Taquari River sediment metals values at the four drinking water abstraction sites.. .....	53
<b>Table 4.</b> Concentration of sixteen priority PAHs <sup>1</sup> analyzed in organic sediment extract from drinking water abstraction sites on the Taquari River. ....	55
<b>Table 5.</b> Summary of the results obtained in the <i>Salmonella</i> /microsome assay in surface water samples in the presence and absence of human S9 at different abstraction sites for supply in Taquari River, expressed in revertants per liter (rev/L) of water sample.....	56
<b>Table A.1.</b> Surface occupied by different types of land use and cover in the Taquari-Anta river basin. Total area delimited and delimited areas of the four sites of water supply abstraction.....	72
<b>Table A.2.</b> Impactful uses and activities in the study regions.....	73

### ARTIGO 2 - Influência de compostos mutagênicos na água potável de quatro cidades do Rio Grande do Sul, Brasil

<b>Tabela 1.</b> Informações sobre amostragem de água bruta e tratada de quatro cidades do Vale do Taquari. ....	81
<b>Tabela 2.</b> Resultados obtidos para mutagenicidade de amostras de água bruta e tratada das estações de tratamento de água das quatro cidades em revertentes por litro (rev / L) de água amostrada .....	89
<b>Tabela 3.</b> Concentração de Micropoluentes presentes nas estações de tratamento de água das cidades banhadas pelo Rio Taquari.....	92



## SUMÁRIO

Agradecimentos.....	i
Resumo.....	iii
Abstract.....	vi
Lista de abreviações.....	ix
Lista de figuras.....	xi
Lista de tabelas.....	xii
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
1.1. Ecossistema aquático.....	14
1.2. Contaminantes presentes no meio aquático.....	16
1.3. Contaminantes na água potável.....	20
1.4. Biomarcadores.....	22
1.4.1. Ensaio <i>Salmonella</i> /microsoma.....	23
1.4.2. Ensaio <i>Allium cepa</i> .....	24
1.4.3. Ensaio FET (Fish Embryo Toxicity) em embriões de <i>Danio rerio</i> .....	24
<b>2. ÁREA DE ESTUDO.....</b>	<b>25</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>29</b>
<b>4. ARTIGOS CIENTÍFICOS.....</b>	<b>31</b>
<b>4.1. CAPÍTULO 1 - EVALUATION OF EFFECT OF HAZARDOUS CONTAMINANTS IN AREAS FOR THE ABSTRACTION OF DRINKING WATER.....</b>	<b>32</b>
ABSTRACT.....	33
1. INTRODUCTION.....	34
2. MATERIALS AND METHODS.....	36
2.1. Study area.....	36
2.2. Sampling Sites.....	38
2.3. Geographic Analysis of the area influenced by the sources of pollution.....	39
2.4. Sample Collection.....	40
2.5. Organic extracts.....	41
2.6. Bioassays.....	42
2.6.1. <i>Salmonella</i> /microsome assay.....	42
2.6.2. <i>Allium cepa</i> assay.....	43
2.6.3. Fish Embryo Toxicity (FET) assay.....	44
2.7. Chemical Analyses.....	46
2.7.1. Metals.....	46
2.7.2. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons.....	47
3. RESULTS.....	47
4. DISCUSSION.....	57
5. CONCLUSION.....	63
6. REFERENCES.....	64
7. APPENDICES.....	71
<b>4.2. CAPÍTULO 2 - INFLUÊNCIA DE COMPOSTOS MUTAGÊNICOS NA ÁGUA POTÁVEL DE QUATRO CIDADES DO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL.....</b>	<b>74</b>
RESUMO.....	75
1. INTRODUÇÃO.....	76
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	80
2.1. Área de estudo.....	80
2.2. Coleta das amostras.....	80
2.3. Extratos orgânicos para testes mutagênicos.....	81
2.4. Ensaio <i>Salmonella</i> /microsoma.....	83
2.5. Análises química: Micropoluentes Emergentes.....	84
3. RESULTADOS.....	85
4. DISCUSSÃO.....	91
5. CONCLUSÃO.....	98
6. REFERÊNCIAS.....	101
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>107</b>
<b>6. REFERÊNCIAS DA TESE.....</b>	<b>112</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Ecossistemas aquáticos

O Brasil é um dos países que possui a maior disponibilidade de ecossistemas de água doce do mundo. Porém seus diferentes usos dependem muito da qualidade que se apresentam os recursos hídricos (Brasil, 2005). A redução da qualidade dos ecossistemas aquáticos está relacionada a alterações do clima, do solo, da vegetação circundante e principalmente da influência antrópica da região. Também dependem de variações temporais e espaciais sofridas em decorrência de processos internos e externos ao corpo d'água (Meybeck & Helmer, 1992). Estes impactos ecológicos acabam ocasionando desestruturação podendo afetar a composição e estrutura da biota aquática, levando a perda da diversidade e até mesmo extinção de espécies.

A influência antrópica é a principal atividade responsável pela deterioração dos mananciais hídricos. As descargas nos ecossistemas aquáticos geralmente são de efluentes de origem agrícola, industrial ou doméstica que liberam elevadas quantidades de nutrientes, como nitrogênio e fósforo. O excesso desses elementos favorece o crescimento de microrganismos fotossintetizantes, afetando a qualidade da água e gerando possíveis problemas à saúde humana (Durigon, 2013). O Inventário de Emissões Tóxicas (Toxic Release Inventory - TRI) da Agência Nacional de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) de 2017 relatou que mais de 150.000 toneladas de produtos químicos foram descartadas diretamente nos recursos hídricos (USEPA, 2017). Na água, muitos desses agentes reagem com a matéria residual gerando novos compostos perigosos, incluindo os genotóxicos. Estes podem ser adsorvidos no material particulado em suspensão e depositados ao longo do tempo no sedimento.

25 O sedimento dos corpos d'água constitui-se em compartimento importante por  
26 representar o histórico da contaminação de muitos poluentes. Além de fornecer habitat,  
27 alimentação e áreas de desenvolvimento para muitos organismos aquáticos, têm fundamental  
28 importância no estudo da evolução histórica dos ecossistemas aquáticos e dos ecossistemas  
29 terrestres adjacentes (Esteves, 1988). Segundo Esteves, (1988), também é importante para a  
30 avaliação da intensidade e formas de impacto a que os ecossistemas estão ou estiveram  
31 submetidos. Adicionalmente, a análise dos sedimentos fornece uma boa indicação sobre a  
32 geologia e a composição química e mineralógica na Bacia Hidrográfica. Especial atenção  
33 deve ser conferida à interação entre água e sedimento, pois a interface entre estes dois  
34 compartimentos atua ao mesmo tempo como depósito e fonte para os metais presentes no  
35 sistema aquático (Förstner & Wittman, 1981). Assim foram desenvolvidos diversos métodos  
36 de avaliação da qualidade dos sedimentos, como instrumentos importantes para a proteção e  
37 conservação dos ecossistemas e da saúde pública.

38 A frequência dos impactos ecológicos citados acima, somados aos diferentes usos da  
39 água pelas atividades antrópicas, tem sido uma preocupação com as bacias hidrográficas  
40 brasileiras (Wetzel, 2001, Tundisi & Matsumura-Tundisi, 2008). Há décadas, grandes rios  
41 têm sido usados como transporte, irrigação, recreação, pesca e abastecimento de água  
42 industrial e potável (Dolédec & Stutzner, 2008). A demanda por uso de água no Brasil é  
43 crescente, com aumento estimado de aproximadamente 80% no total retirado de água nas  
44 últimas duas décadas. A previsão da ANA (Agência Nacional de Águas) é de que, até 2030, a  
45 retirada aumente 24%. O histórico da evolução dos usos da água está diretamente relacionado  
46 ao desenvolvimento econômico e ao processo de urbanização do país. Atualmente, o principal  
47 uso de água no país, em termos de quantidade utilizada, é a irrigação (52%), seguido do  
48 abastecimento humano (23,8%) e da indústria (9,1%). Juntos esses usos representam cerca de

49 85% da retirada total (Brasil, 2018). Legislações como a Resolução nº 357/2005 do  
50 CONAMA e a Portaria nº 518/2004 do Ministério da Saúde, buscam classificar e proteger as  
51 águas dos mananciais, bem como estabelecem normas e padrões para a qualidade da água  
52 para consumo humano (Brasil, 2005; Moraes et al., 1999).

53 A água é um elemento fundamental para a manutenção da vida em nosso planeta.  
54 Segundo a ONU (Organização das Nações Unidas), cada ser humano necessita de 20 a 50  
55 litros de água doce para suprir suas necessidades básicas diárias, distribuídos entre ingestão  
56 direta, higiene, saneamento e preparação de alimentos (Brasil, 2006a). A exposição à água  
57 contaminada, principalmente através da ingestão de nocivos a saúde, provocam aparecimento  
58 de inúmeras enfermidades. A maior parte das doenças transmitidas para o ser humano é  
59 causada por microrganismos, particularmente vírus, bactérias, protozoários e helmintos  
60 (Brasil, 2006b). A ocorrência desse tipo de doença pode ser minimizada ou até mesmo evitada  
61 mediante a adoção de práticas adequadas de saneamento, como, por exemplo, coleta e  
62 tratamento de esgotos domésticos e tratamento de águas de abastecimento. Para que os  
63 sistemas de abastecimento de água cumpram com eficiência sua função de proteger os  
64 consumidores, é essencial um adequado e cuidadoso desenvolvimento de todas as suas fases:  
65 a concepção, o projeto, a implantação, a operação e a manutenção. O primeiro passo é a  
66 escolha do manancial de onde o sistema será suprido, pois mananciais livres de contaminantes  
67 naturais deveriam ser priorizados e protegidos contra a contaminação de natureza química ou  
68 biológica provocada pelas diversas atividades antrópicas (Brasil, 2006b).

69

## 70 **1.2. Contaminantes presentes no meio aquático**

71

72

73 A vulnerabilidade do ambiente aquático às substâncias químicas depende de muitos  
74 fatores que envolvem desde as propriedades físicas e químicas dos contaminantes e dos

75 produtos resultantes de sua transformação, além de outros fatores como: duração e tipo de  
76 descarga (descarga intermitente ou contínua); propriedades do ecossistema que permitam  
77 resistir à presença dos estressores; além da localização do ecossistema em relação ao sítio de  
78 lançamento dos contaminantes (Rand & Petrocelli, 1985). Entre os contaminantes presentes  
79 no sedimento, água intersticial e superficial estão os compostos orgânicos (como os  
80 Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos - HPAs, nitroarenos, aminas aromáticas) e os metais  
81 pesados. Segundo o TRI de 2002, citado por Chen & White, (2004), aproximadamente 58%  
82 do material descartado nos recursos hídricos compreendia uma variedade de compostos  
83 orgânicos e 42% de metais e compostos metálicos.

84 Os HPAs são compostos formados por dois ou mais anéis de benzeno condensados,  
85 gerados sempre que substâncias orgânicas são expostas a altas temperaturas sob baixo  
86 oxigênio ou sem condições de oxigênio (Abdel-Shafy, 2016). Os HPAs estão associados a  
87 derramamentos de óleo cru e refinados; compostos formados pela combustão de combustíveis  
88 fósseis, incineração de resíduos, queima de biomassa e produção de asfalto (Hong et al.,  
89 2016). Vários produtos industriais são derivados do alcatrão de carvão, incluindo combustível  
90 para automóveis, fertilizantes e creosoto de alcatrão, um destilado complexo de alcatrão de  
91 carvão usado para a preservação da madeira (IARC, 2010). Vários HPAs apresentam  
92 características citotóxicas, mutagênicas e carcinogênicas (IARC, 2010), e alguns foram  
93 reconhecidos recentemente como disruptores endócrinos (WHO, 2013). HPAs e seus  
94 derivados estão associados ao aumento da incidência de diversos tipos de câncer no homem  
95 (Pereira Netto et al., 2000).

96 A contribuição de nitrocompostos no potencial mutagênico de ambientes aquáticos,  
97 principalmente dos sedimentos fluviais, foram relatados no Lago Ontário (Canadá) (Marvin et  
98 al., 2000), Rio Pó (Itália) (Vigano et al., 2001), e no Rio Cristais (Brasil) (Umbuzeiro et al.,

99 2004). Entre esses compostos, os nitroarenos incluem uma grande classe de moléculas  
100 encontradas nas emissões de particulados de fontes de combustão, como os escapamentos de  
101 diesel. Juntamente com aminas aromáticas, elas são produzidas durante os processos de  
102 fabricação nas indústrias de corantes, pesticidas e plásticos. Também podem resultar de  
103 reações atmosféricas envolvendo HPAs adsorvidos em partículas de ar e NO<sub>2</sub> (Claxton &  
104 Woodall, 2007). A atividade mutagênica dos nitroarenos está bem estabelecida e  
105 documentada (Tokiwa et al., 1987; Claxton & Woodall, 2007; Lemos et al., 2016).

106 Os metais são considerados como os principais compostos tóxicos e genotóxicos  
107 presentes nas frações hidrossolúveis. Devido à suas propriedades químicas e capacidade de  
108 catalisar reações redox *in vivo*, os metais são microelementos essenciais para múltiplas  
109 funções fisiológicas. Também têm a capacidade de iniciar reações de auto-oxidação que  
110 levam à formação de oxigênio reativo. Arsênio, cádmio, cromo, cobalto e níquel foram  
111 identificados como mutagênicos e carcinogênicos para humanos e animais, enquanto o ferro e  
112 o cobre estão sendo pesquisados por induzir riscos genéticos a longo prazo (Asakura et al.,  
113 2009).

114 A crescente produção e consumo de produtos químicos tem sido associada à presença  
115 de novas substâncias no ambiente. Essas substâncias são móveis, onipresentes, persistentes e  
116 bioacumulativas na biota e tecido humano, levantando assim uma série de questões sobre os  
117 riscos para o ser humano (Fawell & Ong, 2012; Focazio et al., 2008; Nam et al., 2014).  
118 Avanços nas técnicas de análises químicas têm detectado uma ampla quantidade de  
119 compostos previamente indetectáveis no ambiente aquático, sendo estes identificados e  
120 quantificados em baixas concentrações de microgramas ou nanogramas por litro (Fawell &  
121 Ong, 2012; Rivera-Utrilla et al., 2013). Estes são os micropoluentes (ME), também  
122 denominados contaminantes emergentes, que consistem em um amplo e crescente conjunto de

123 substâncias naturais e antropogênicas. Entre eles estão os produtos farmacêuticos, de cuidados  
124 pessoais, hormônios esteróides, disruptores endócrinos, substâncias químicas industriais e  
125 pesticidas (Luo et al., 2014). Em vários países as estações de tratamento de águas residuais  
126 (ETARs) ainda não são projetadas para eliminar micropoluentes. Assim, muitos desses são  
127 capazes de passar pelos processos de tratamento de águas residuais devido à sua persistência  
128 ou introdução contínua. Além disso, as precauções e ações de monitoramento para  
129 micropoluentes não estão bem estabelecidas na maioria das ETARs (Bolong et al., 2009).  
130 Conseqüentemente, muitos desses compostos podem chegar ao ambiente aquático, tornando-  
131 se ameaças à biota e comprometimento da qualidade da água potável. A ocorrência de  
132 micropoluentes nesses ambientes tem sido frequentemente associada a vários efeitos  
133 negativos, incluindo toxicidade a curto e a longo prazo, desregulação endócrina, resistência de  
134 microrganismos à antibióticos, além de efeitos mutagênicos, carcinogênicos e  
135 teratogênicos (Fent et al., 2006; Pruden et al., 2006; Guillén et al., 2012).

136 As fontes de entrada desses compostos no meio aquático estão relacionadas,  
137 principalmente, com a maneira inadequada de descarte de resíduos, sejam de origem  
138 industrial, agrícola, hospitalar e doméstica. Ainda existem as formas indiretas, através das  
139 fezes e urina após o seu consumo por seres humanos e animais (no caso de medicamentos), o  
140 que é evidentemente mais difícil de prevenir. Dentre os MEs detectados na água destacam-se:  
141 os fármacos (paracetamol, ácido acetilsalicílico, diclofenaco, tetraciclina, amoxicilina,  
142 cafeína), os pesticidas (atrazina, diuron, 2-nitrofenol e 4-nitrofenol) e outros fenóis. Até o  
143 momento, não existem diretrizes e padrões de descarga para a maioria dos micropoluentes.  
144 Para estabelecer limites regulatórios, pesquisas adicionais sobre respostas biológicas a esses  
145 compostos (efeitos de curto e longo prazo) são de particular importância (Tijani et al., 2016).

146

### 1.3. Contaminantes na água potável

A desinfecção da água foi um dos mais importantes avanços em saúde pública dos tempos modernos. Assim, muitos dos efeitos associados à transmissão de doenças infecciosas pela água foram significativamente reduzidos (embora em muitas regiões do mundo ainda exista precariedade no fornecimento de água) (WHO, 2015). No entanto, desinfetantes químicos reagem com matéria orgânica e íons inorgânicos presentes na água bruta, formando novas espécies químicas, os subprodutos da desinfecção da água (DBPs). Nos últimos 40 anos, pesquisas verificaram potenciais riscos para a saúde apresentados por esses compostos como: aumento de casos de câncer de bexiga, complicações do desenvolvimento e reprodução dos organismos (Grellier et al., 2015; Legay et al., 2010; Nieuwenhuijsen et al., 2013).

No tratamento convencional de água são utilizados processos físico-químicos para a potabilização, dentre as quais as unidades de clarificação (floculadores, decantadores e filtros), de desinfecção (cloradores e aminoadores), correção do pH e fluoretação. Assim como nas ETE (Estações de Tratamento de Esgoto), os processos convencionais de tratamento nas ETA (Estações de Tratamento de Água) não têm sido eficientes para a eliminação de todos contaminantes presentes na água bruta (Wang et. al., 2011; Stackelberg et. al., 2007; Bodzek e Dudziak, 2006). Portanto, as extensas revisões de Richardson et al. (2007) e Córtes & Marcos (2018) descreveram informações relevantes sobre substâncias tóxicas, genotóxicas e efeitos cancerígenos dos DBPs. Mais de 600 DBPs já foram identificados, mas apenas alguns deles foram analisados quanto ao seu potencial citotóxico, genotóxico e impactos na saúde (Plewa et al, 2008; Cemeli et al., 2006; Plewa & Wagner, 2011). O cloro é o desinfetante mais comumente utilizado e tem sido associado à formação de trihalometanos (THMs), ácidos haloacéticos (HAAs), halonitrometanos (HNMs), haloacetoneitrilos, cloraminas, clorofenóis, os chamados Mutagênico X (MX), entre outros



172 (Córtes & Marcos, 2018). Apesar do grande número de DBPs formados durante a  
173 desinfecção, estudos avaliando a mutagenicidade de DBPs individuais em bactérias se  
174 concentraram principalmente nas N-nitrosaminas (N-nitrosodimetilamina - NDMA) e nas  
175 halofuranona, MX (Cortés & Marcos, 2018).

176 Assim como na água superficial (bruta), os MEs também têm sido encontrados na  
177 água potável. Embora Westerhoff et al. (2005) tenham mostrado que a presença da etapa de  
178 cloração promove uma redução de 20 a 90 % nos níveis de concentração, dependendo das  
179 características de cada composto, estudos relataram que o tratamento não tem sido eficiente  
180 para eliminação de inúmeros micropoluentes (Wang et. al., 2011; Stackelberg et. al., 2007;  
181 Bodzek e Dudziak, 2006). A formação de DBPs potencialmente perigosos durante o processo  
182 de desinfecção tem sido uma preocupação mundial. Diante disso, Postigo & Richardson  
183 (2014) relataram que analgésicos como paracetamol (acetaminofeno) mostraram que sua  
184 reação com o cloro tem formado numerosos subprodutos, sendo dois deles considerados  
185 compostos tóxicos. Ainda verificou-se que a cloração do diclofenaco forma pelo menos cinco  
186 novos subprodutos (Bedner & MacCrehan, 2006).

187 A atrazina é um dos herbicidas mais consumidos no Brasil (IBAMA, 2010). Sua  
188 principal via de exposição ao Homem é a ingestão de água tratada, uma vez que a exposição  
189 por alimentos não é significativa (ATSDR, 2008), além do que as estações de tratamento de  
190 água não são capazes de remover este contaminante com eficiência (Benotti et al., 2009;  
191 Verliefde et al., 2007; Quintana et al., 2001). A cafeína, presente em produtos alimentícios e  
192 medicamentos, tem sido usada como traçador de contaminação por esgoto doméstico em  
193 situações onde há vazamentos na rede coletora capazes de atingir outros cursos d'água. É  
194 considerado um marcador químico sensível e específico que pode ser detectado rapidamente,

195 pois se apresenta em altas concentrações no esgoto, é estável e bastante solúvel em água  
196 (Raimundo, 2011).

197 Com base em resultados epidemiológicos, vários países e organizações internacionais  
198 criaram diretrizes e regulamentos que estabelecem níveis máximos de diferentes DBPs,  
199 particularmente os mais abundantes. Apesar desses esforços, apenas alguns dos DBPs  
200 atualmente conhecidos foram analisados e regulamentados (Cortés & Marcos, 2018). Nos  
201 EUA, a USEPA tem a responsabilidade de proteger as águas superficiais e subterrâneas do  
202 país, para fornecimento de água potável segura para consumo público (Warren et al., 2015).  
203 A USEPA determina os níveis máximos de 11 DBPs na água potável, enquanto as diretrizes  
204 da OMS (Organização Mundial da Saúde) incluem 14 DBPs (Richardson et al., 2007). No  
205 Brasil alguns subprodutos, de grupos químicos específicos, são regulamentados na Resolução  
206 nº 357/2005 para Água doce e potável (Brasil, 2005). Dentre eles estão os HPAs, orgânicos  
207 halogenados alcalinos, compostos aromáticos halogenados e os THMs. Os MEs são  
208 considerados compostos relativamente “novos” e pouco regulamentados mundialmente.

#### 209 **1.4. Biomarcadores**

210 Os biomarcadores são considerados excelentes indicadores precoces de contaminação,  
211 sendo ferramentas importantes na adoção de medidas preventivas aos danos causados pela  
212 poluição ambiental. Isto ocorre porque efeitos em níveis superiores de organização biológica  
213 são precedidos por mudanças nos processos biológicos, de forma que os biomarcadores  
214 servem como um alerta precoce de efeitos tardios (Bayne et al., 1985; Van der Oost et al.,  
215 2003). A utilização de biomarcadores de genotoxicidade é apropriada para a análise de risco  
216 relativo no ambiente e vários estudos relacionam danos no DNA com subseqüentes alterações  
217 a nível molecular, celular e tecidual nos organismos (Ohe et al., 2004).

218  
219  
220  
221  
222  
223  
224  
225  
226  
  
227  
228  
229  
230  
231  
232  
233  
234  
235  
236  
237  
  
238  
239  
240

#### 1.4.1. Ensaio *Salmonella*/microsoma

O método é amplamente utilizado para identificar atividade mutagênica em amostras ambientais, além de auxiliar na comparação de sítios, identificação de fontes e possíveis carcinógenos presentes em misturas ambientais complexas (Claxton et al., 2010). As linhagens de *Salmonella*, auxotróficas para histidina apresentam mutações preexistentes no operon deste aminoácido, sendo incapazes de crescer em meio sem histidina, a menos que ocorram mutações reversas e a capacidade de sintetizar o aminoácido seja restaurada. A resposta do ensaio é avaliada em número de colônias revertentes por concentração testada. Diversas linhagens foram projetadas para detectar uma ampla variedade de compostos.

Os compostos orgânicos semi-voláteis e não-voláteis de natureza polar e apolar, extraídos pelas resinas Amberlite XAD a partir de grandes volumes de água, tem evidenciado potencialidade tóxica e genotóxica em diversos tipos de ensaios, sendo diagnosticados como mutagênicos no ensaio *Salmonella*/microsoma (Zeiger, 1998; Mortelmans & Zeiger, 2000). No entanto, devido a muitos cancerígenos atuarem em mecanismos mutagênicos, a maioria dos agentes cancerígenos orgânicos mutagênicos são positivos no ensaio de *Salmonella* (Zeiger, 1998). Diante desse fato, este ensaio é utilizado, no presente contexto, em muitos trabalhos com diferentes matrizes ambientais, tais como para águas superficiais (Ohe et al., 2004; Vargas et al., 2008), sedimentos (Chen & White, 2004; Tagliari et al., 2004), água potável (Richardson et al., 2007; Pereira et al., 2007; Córtes & Marcos, 2018), solo (White & Claxton, 2004; Pohren et al., 2012) e ar (Claxton et al., 2004; Coronas et al., 2013).

#### 241 **1.4.2. Ensaio *Allium cepa***

242 O emprego de vegetais como organismos teste tem sido indicado e validado por  
243 diversas agências de proteção ambiental, como o UNEP (Programa Ambiental das Nações  
244 Unidas), OMS e a USEPA. Os testes mais indicados para o estudo do monitoramento  
245 ambiental são aqueles de fácil execução e com boa capacidade de gerar resultados rápidos  
246 (Fiskejo, 1985). Dentre os vegetais superiores, a *Allium cepa* tem sido frequentemente  
247 utilizada por apresentar seus cromossomos com número reduzido e de grande tamanho,  
248 facilitando a análise (Fiskejo, 1985), além de alta sensibilidade na detecção de produtos  
249 químicos ambientais (Leme & Marin-Morales, 2009), tem sido empregada, na avaliação de  
250 sedimentos *in natura* e solos (Chen & White, 2004; White & Claxton, 2004 ). É utilizado para  
251 estudar as atividades citotóxicas, genotóxica e mutagênica por meio de parâmetros avaliados  
252 como aberrações cromossômicas e micronúcleo (Ma et al., 1995).

253 A análise de micronúcleo (MN) é um método citogenético eficiente para a avaliação  
254 de alterações cromossômicas. O MN é formado por fragmentos de cromossomos ou  
255 cromossomos inteiros que não foram incorporados ao núcleo no momento da mitose (Fenech  
256 & Bonassi, 2011). O teste para detecção do MN tem sido sensível ao efeito da contaminação  
257 nos diversos compartimentos ambientais (Bonassi et al, 2007; Holland et al., 2008; Fenech &  
258 Bonassi, 2011). Os MNs aparecem a partir do desenvolvimento de algumas alterações  
259 cromossômicas, por exemplo, quebras e perdas cromossômicas (Leme & Marin-Morales,  
260 2009).

#### 261 **1.4.3. Ensaios FET (Fish Embryo Toxicity) em embriões de *Danio rerio***

262 O uso de peixes como indicadores da qualidade ambiental oferece vantagens específicas  
263 porque estes, além de apresentarem sensibilidade aos impactos sobre o ambiente aquático,

264 respondem a agentes tóxicos de forma semelhante a outros vertebrados superiores, incluindo  
265 mamíferos. Permite avaliação de potenciais efeitos teratogênicos, mutagênicos e  
266 carcinogênicos não apenas para peixe, mas também possivelmente para os seres humanos  
267 (Lemos et al., 2007). Zebrafish (*Danio rerio*), é um pequeno teleósteo (3 a 4 cm), de  
268 ambiente tropical de água doce amplamente utilizado em estudos comportamentais, genéticos,  
269 toxicológicos e para desvendar o mecanismo de diversas doenças humanas bem como testar  
270 novos agentes terapêuticos (Lieschke & Currie, 2007; Kari et al., 2007). As principais  
271 justificativas para isso decorrem de os peixes serem de pequeno porte, de manutenção fácil,  
272 econômicos para criação e com alta taxa reprodutiva. Uma alternativa a substituição dos  
273 ensaios convencionais com organismos-teste adultos a OECD 236 (OECD, 2013) elaborou  
274 um protocolo para ensaios de toxicidade aguda de 96 horas que utiliza embriões recém-  
275 fertilizados. Este tipo de ensaio tem se apresentado como uma ferramenta promissora para  
276 substituir os ensaios agudos baseados em peixes adultos (Braunbeck et al, 2005; Nagel, 2002).  
277 A fertilização dos ovos do zebrafish é externa, e os embriões apresentam uma série de  
278 características que os tornam próprios para modelo de estudo. Dentre tantos fatores  
279 relevantes, podem ser citados: córion translúcido, resistência à manipulação, genoma  
280 sequenciado, extensa homologia genética com outras espécies de vertebrados inclusive  
281 humanos (Kimmel et al, 1995; Long et al., 1997; Barbazuk et al., 2000; Briggs, 2002;  
282 Grunwald & Eisen, 2002; Schneneider et al., 2009; Dammski et al., 2011; Huszno & Klag,  
283 2012; Stuelten et al., 2018).

## 284 **2. Área de estudo**

285 A área onde o estudo foi realizado está localizada na porção mais baixa do Rio  
286 Taquari, pertencente à Bacia Hidrográfica Taquari-Antas, situada no estado do Rio Grande do  
287 Sul - Brasil, entre as coordenadas 28°10'S a 29°57'S e 49°56'W a 52°38'W. Bom Retiro do

288 Sul, Taquari, Triunfo e General Câmara pertencem à região do Vale do Taquari, com fonte  
289 econômica a partir do agronegócio, produção de alimentos e indústrias (Tabela 1). A área  
290 total deste rio é de 2.640.930.40 ha e a de interesse neste trabalho abrange uma área  
291 de 292.555,70 ha compreendendo as sub-bacias do Arroio Sampaio/Estrela e do Baixo  
292 Taquari (RS, 2012). Estudos anteriores verificaram evidências de contaminação no sedimento  
293 deste rio próximo à área com solo contaminado com passivo ambiental de preservantes de  
294 madeira (pentaclorofenol, creosoto e arseniato de cobre cromado - CCA) (Costa et al., 2012;  
295 2017; Gameiro et al., 2018a; Pohren et al., 2012). Estes produtos apresentam reconhecida  
296 ação tóxica e genotóxica (Appel et al., 2007). Gameiro et al. (2018a) ainda detectou  
297 mutagênese nas diferentes fases do processo de remediação do sítio de solo contaminado e  
298 também mostrou evidências de contaminação por agentes mutagênicos em local de captação  
299 de água potável. Entre as áreas avaliadas, o Ta006 (Ta significa as iniciais do rio seguidas  
300 pela quilometragem de distância em relação à foz), situado em General Câmara, 4 km à  
301 jusante de sítio contaminado e Ta032, a 21 km à montante deste sítio, fora de sua área de  
302 influência.

303 A escolha dos locais levou em consideração a qualidade dos sedimentos e água,  
304 focando áreas de captação de água potável das quatro regiões da bacia (Figura 1). Tendo por  
305 base a Resolução CONAMA nº 357/2005 (Brasil, 2005), que estabelece os padrões de  
306 qualidade da água e os limites para seus diferentes usos, o Comitê da Bacia do Rio Taquari-  
307 Antas, em 2012 (RS, 2012), evidenciou que a região do Baixo Taquari (engloba Taquari,  
308 Triunfo e General Câmara), atualmente apresenta qualidade de uso compatível com classe 4  
309 (classe não adequada para captação de água potável), tendo como proposta de enquadramento  
310 para 10 anos, a classe 3 (destinada à dessedentação de animais e ao abastecimento para  
311 consumo humano, após tratamento convencional ou avançado) e em 20 anos, a classe 2

312 (destinada à proteção das comunidades aquáticas e ao abastecimento para consumo humano,  
 313 após tratamento convencional). Já a sub-bacia do Arroio Sampaio/Estrela, que atualmente  
 314 apresenta qualidade de uso compatível com classe 3, tem na portaria de enquadramento para  
 315 10 anos manter a classe 3 e, em 20 anos, classe 2. Estes enquadramentos têm por base os  
 316 níveis de qualidade para atender as necessidades futuras, definidas pela sociedade.

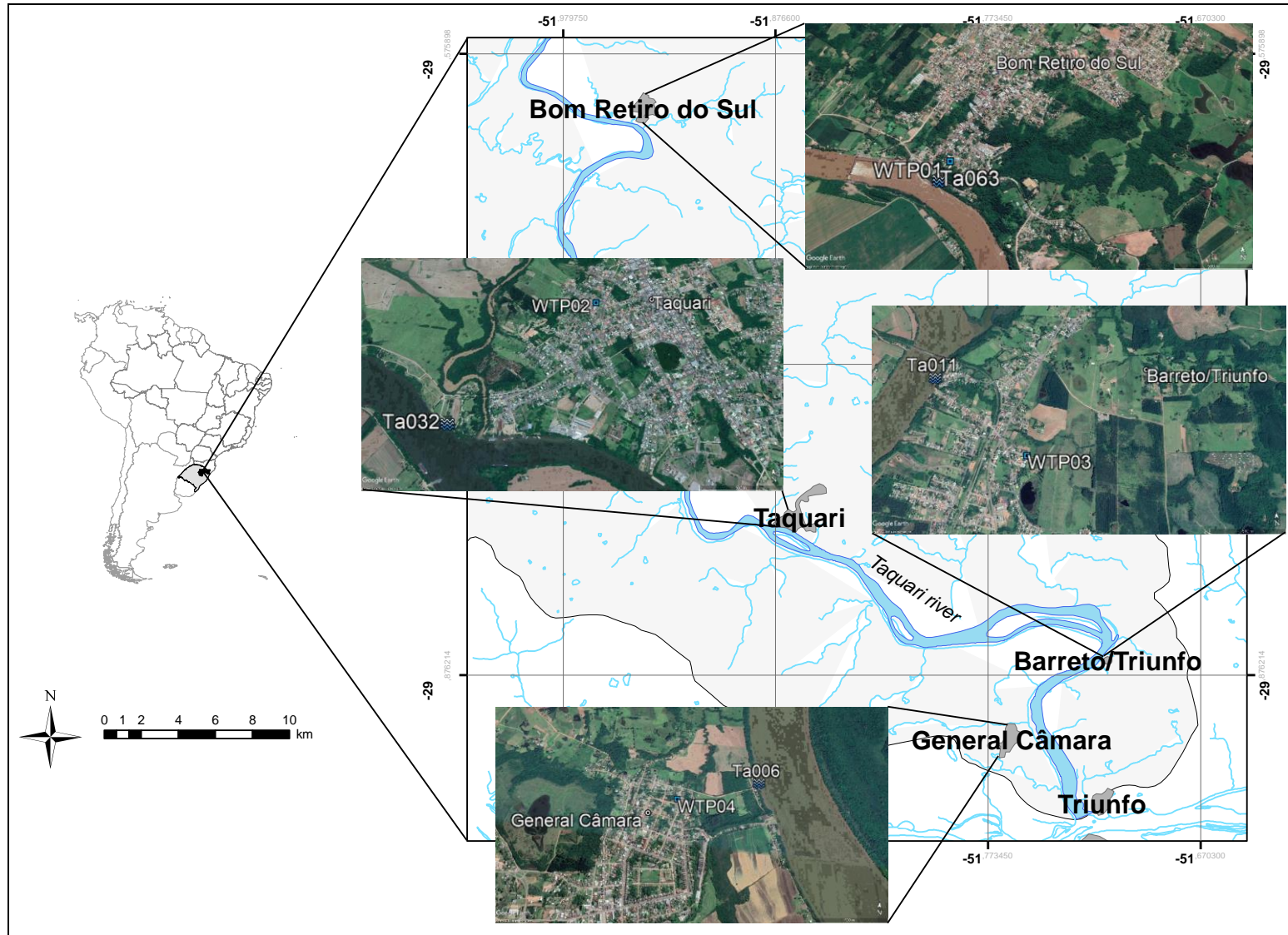
317 As amostras de água e sedimento da primeira etapa do estudo foram coletadas às  
 318 margens do Rio Taquari em frente à bomba de captação de água e na segunda etapa, as águas  
 319 antes e depois do tratamento convencional, foram coletadas dentro das estações de tratamento  
 320 (water treatment plant sites = WTP).

321 **Tabela 1** – Descrição dos pontos de amostragem, em área de captação de água potável

<b>Captção de água</b>	<b>Coordenadas</b>	<b>ETAS</b>	<b>Coordenadas</b>	<b>Cidades</b>
Ta063 <sup>a</sup>	29°36'36.62"S; 51°56'36.04"W	WTP01 <sup>b</sup>	29°36'33.08"S; 51°56'35.17"W	Bom Retiro do Sul
Ta032	29°48'21.86"S; 51°52'50.86"W	WTP02	29°47'53.93"S; 51°52'11.69"W	Taquari
Ta011	29°51'58.5"S; 51°42'55.82"W	WTP03	29°52'18.57"S; 51°42'33.75"W	Distrito de Barreto/ Triunfo
Ta006	29°54'3.10"S; 51°45'9.30"W	WTP04	29°54'8.88"S; 51°45'34.57"W	General Câmara

322 <sup>a</sup>Ta: letras iniciais do rio (Ta) seguidos da quilometragem de distância em relação à foz.

323 <sup>b</sup>WTP: estações de tratamento de água.



324

325

326

327

**Figura 1.** Localização das quatro cidades estudadas que utiliza o Rio Taquari como fonte de água potável e seus pontos de captação. Ta: letras iniciais do rio (Ta) seguidos da quilometragem de distância em relação à foz; WTP: estações de tratamento de água.



### 328 3. OBJETIVOS

#### 329 3.1. Geral

330 Analisar a presença de contaminantes em locais de captação de água potável,  
331 definindo as fontes e os efeitos tóxicos e genotóxicos desses estressores como um parâmetro  
332 de qualidade para o ecossistema, sua influência na água tratada e possíveis reflexos para a  
333 saúde humana.

#### 334 3.2. Específicos

- 335 • Realizar o mapeamento de uso e ocupação do solo nas áreas de interesse através de  
336 ferramentas de geoprocessamento rastreando possíveis fontes de contaminantes;
- 337 • Verificar a presença de contaminantes através de indicadores biológicos para  
338 toxicidade aguda e crônica em amostras de água e genotoxicidade em sedimento do  
339 Rio Taquari, contribuindo no planejamento das metas de qualidade para o seu  
340 enquadramento na Resolução CONAMA nº 357/2005;
- 341 • Avaliar a mutagenicidade de extrato orgânico de sedimento do rio Taquari através do  
342 ensaio *Salmonella*/microsoma como parâmetro precoce no diagnóstico da qualidade  
343 ambiental;
- 344 • Associar a qualidade da água tratada com o grau de contaminação dos mananciais na  
345 área de captação de água potável;
- 346 • Analisar o potencial genotóxico de extratos orgânicos de amostras de grandes volumes  
347 de água destinadas ao abastecimento público, como possível indicativo de perigo à  
348 saúde humana;

- 349
- Avaliar os extratos de água após tratamento convencional para abastecimento quanto à
- 350
- permanência de genotoxinas presentes na água superficial em áreas impactadas por
- 351
- diferentes atividades antrópicas;
- 352
- Relacionar os efeitos tóxicos e genotóxicos com compostos químicos presentes nas
- 353
- áreas e subprodutos gerados na água tratada;
- 354
- Avaliar a presença de micropoluentes emergentes na água antes e após tratamento;
- 355
- Discutir junto com órgãos responsáveis pela preservação ambiental, saneamento e
- 356
- saúde medidas saneadoras visando garantir a qualidade do ecossistema e seu reflexo
- 357
- no abastecimento público.

358

359

360

361

362

363

364

365

366

367

368

369

370

371

372

373

374

375

376

377

378

379

380

381

382

383

384

385

386

387

388

389

390

391

392

393 **4. ARTIGOS CIENTÍFICOS**

394 Esta tese permitiu a elaboração de dois capítulos correspondentes aos artigos  
395 científicos resultantes do projeto desenvolvido.

396 O primeiro artigo “*Evaluation of effect of hazardous contaminants in areas for the*  
397 *abstraction of drinking water*”, submetido à revista Environmental Research, investigou a  
398 presença de contaminantes em locais de captação de água potável, definindo as fontes e os  
399 efeitos mutagênicos desses estressores como um parâmetro de qualidade para o ecossistema e  
400 possíveis reflexos para a saúde humana.

401 O segundo artigo “*Influência de compostos mutagênicos na água potável de quatro*  
402 *idades do Rio Grande do Sul, Brasil*” analisou a influência da carga orgânica presente na água  
403 do Rio Taquari, através do ensaio *Salmonella*/microsoma, na qualidade da água potável  
404 distribuída para a população da região do Vale do Taquari e a presença de subprodutos  
405 genotóxicos gerados durante o processo convencional de tratamento.

406

407

408

409

410

411

412

413

414

415

416 **4.1. Capítulo 1 - Evaluation of effect of hazardous contaminants in areas**  
417 **for the abstraction of drinking water**

418  
419 Paula Hauber Gameiro <sup>a</sup>, Kauê Hohn Assis <sup>b</sup>, Heinrich Hasenack <sup>c</sup>, Alexandre Arenzon <sup>c</sup>,  
420 Kewen Ubirajara Dias Silva <sup>b</sup>, Clarice Torres de Lemos <sup>b</sup>, and Vera Maria Ferrão Vargas<sup>ab,c\*</sup>

421  
422 <sup>a</sup>Programa de Pós-graduação em Ecologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
423 (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9500, 91501-970, Cx Postal 15007, Porto Alegre, RS, Brazil

424 <sup>b</sup>Divisão de Laboratórios, Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luís Roessler  
425 (FEPAM), Rua Aurélio Porto, 37, 90620-090, Porto Alegre, RS, Brazil.

426 <sup>c</sup>Centro de Ecologia (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9500. Setor 4, prédio 43411, 91.501-  
427 970, Campus do Vale, Porto Alegre, RS, Brazil.

428  
429  
430 \*Programa de Pós-graduação em Ecologia  
431 Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)  
432 Av. Bento Gonçalves, 9500, Cx Postal 15007, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil  
433 E-mail verafvargas@gmail.com.

453 **Abstract**

454

455 The lower portion of Taquari River is influenced by compounds from anthropic  
456 activities causing concern about the drinking water supplied to cities in the region. The study  
457 objective was to investigate the presence of contaminants at drinking water abstraction sites,  
458 defining the mutagenic effects of these stressors as a quality parameter for the ecosystem and  
459 possible effects on human health. Geographic Information System techniques were used to  
460 investigate sources of contamination and it was found that agricultural activities predominated  
461 with a few, medium and high potential pollutant agricultural activities, besides an area of soil  
462 contaminated and undergoing an intervention process. Mutagenic effects were evaluated by  
463 *Salmonella*/microsome assay using TA98, TA97a, TA100, YG1041 and YG1042 strains in  
464 the presence and absence of metabolic activation (S9). Mutagenesis found in organic extracts  
465 of sediment and surface water samples showed the prevalence of direct-acting mutagens at the  
466 drinking water abstraction sites. Taquari (Ta032, the sampling points were named according  
467 to the initial letters of the river (Ta), followed by the number of kilometers away from the  
468 mouth) showed the highest mutagenic potency in sediment, while Ta063, at Bom Retiro do  
469 Sul, presented it in the water sample. In the Triunfo region (Ta011) there were significant  
470 responses in sediment and in water samples. The samples at General Câmara (Ta006) showed  
471 the least presence of contaminants. The *Allium cepa* test applied to sediments *in natura*  
472 showed significant micronucleus induction in Ta032 in accordance with the  
473 *Salmonella*/microsome assay. The test performed on *Danio rerio* embryos (FET) in the *in*  
474 *natura* water samples did not present significant responses. Chemical analyses of polycyclic  
475 aromatic hydrocarbons and metals already identified as chemical markers in the area indicated  
476 a small contribution to the mutagenic potency, calling attention to the fact that other direct-  
477 acting pollutants may be present at the drinking water abstraction sites.

478 **Key words:** Aquatic contaminants, organic extracts, rainwater runoff, water treatment plant,  
479 *Salmonella*/microsome assay, *Allium cepa* test, genotoxic compounds, sediment.

480

481

482

483

484

485

## 486        **1. Introduction**

487        The aquatic ecosystem receives a large amount of pollutants from natural processes and  
488 especially from human activities. Mostly these substances enter the surface water through  
489 treated and non-treated residual waters of industries, agriculture, hospitals and domestic  
490 effluents (Hug et al., 2015). Once in the environment, the contaminants are subject to a  
491 combination of abiotic and biotic processes that affect their destination and behavior (Holt,  
492 2000). Some of them resist the degradation processes and therefore can persist in the  
493 environment for long periods, such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), pesticides,  
494 pharmaceutical products and products for personal use. PAHs are classified by the European  
495 Union and by USEPA (United States Environmental Protection Agency) as priority  
496 environmental pollutants, because of their mutagenic impact on humans (Song et al., 2009).  
497 Some of them are also classified as human carcinogens by the IARC (International Agency  
498 for Research on Cancer) (IARC, 2010). Metals, which are more than 40% of the carcinogenic  
499 materials released into surface waters (Chen & White, 2004), are currently considered the  
500 main toxic and genotoxic compounds present in the water-soluble fractions (Rigaud et al.,  
501 2012).

502        The consequences of a given pollutant depend on its concentration, source, properties  
503 of the water bodies and their uses. Different studies showed that sources of contamination  
504 with toxic substances induce genetic and toxicological damage (Cardozo et al., 2006; Stahl,  
505 1991; Valent et al., 1993; Vargas et al., 1995). The assays performed with bacteria such as  
506 *Salmonella*/microsome; micronuclei in plants and Zebrafish (*Danio rerio*) have been utilized  
507 as methods to analyze the ecogenotoxicity in the aquatic environment (Fenech, 1993; Li et al.,  
508 2007; Monica et al., 1995; Xing et al., 2002; Costa et al., 2012; 2017).

509 *Salmonella*/microsome is a widely accepted short-term assay to identify substances  
510 that may produce genetic damage (Mortelmans & Zeiger, 2000). It is used worldwide to  
511 detect the mutagenicity of complex mixtures dispersed in water, sediment, soil and air (Chen  
512 & White, 2004; Claxton et al., 2004; Ohe et al., 2004; White & Claxton, 2004). Many  
513 carcinogenic compounds are inactive until they are enzymatically transformed into an  
514 electrophilic species, which can bond covalently to DNA, leading to mutation (Hakura et al.,  
515 2005). Thus, metabolic activation is considered a critical step for mutation, and especially  
516 human S9 fractions have been used to predict the metabolism of drugs in humans, since they  
517 reproduce this response more faithfully (Hakura et al., 2005). Besides, these authors showed  
518 that each S9 fraction of different organisms produces different rates of damage to DNA,  
519 detected by *Salmonella typhimurium* strains. In the literature these strains have been  
520 considered sensitive to the presence of environmental contaminants, including metals (direct  
521 assays) and PAHs (associated with metabolic activation) (Chen & White, 2004; Pohren et al.,  
522 2012; Coronas et al., 2013).

523 The *Allium cepa* test was used, employing meristematic cells to detect environmental  
524 pollutants present in water, sediment and soils (Fernandes et al., 2007; Leme & Marin-  
525 Morales, 2009; Pohren et al., 2013; Costa et al., 2012; 2017). The test allows evaluating  
526 parameters that measure toxicity, such as changes in germination, root growth and cell  
527 division, as well as genotoxicity, such as chromosomal aberrations and micronuclei in plant  
528 cells (Grant, 1994; Leme & Marin-Morales, 2009; Nunes et al., 2011). Tests in fish have been  
529 used to evaluate acute and chronic toxicity and have been accepted as representative of the  
530 vertebrates for aquatic environments (Lammer et al., 2009; Henn & Braunbeck, 2011).  
531 Moreover, they allow estimating the potential toxic, embryogenic and teratogenic effects not  
532 only in fish but also in human beings (Lemos et al., 2007). Fish embryos are a promising tool

533 to substitute the acute tests based on adult fish (Braunbeck et al., 2005; Nagel, 2002), and  
534 have the advantage of examining different parameters in a single test.

535 Taquari River regions in the Taquari Antas River Basin have been impacted by  
536 different human activities. Due to local geology and deforestation, this river (approximately  
537 500 km long) receives a large contribution of agricultural, livestock, industrial and domestic  
538 wastes through rainfall runoff (Zanotelli et al., 2004). Gameiro et al. (2018a) showed  
539 evidence of contamination by mutagenic agents at drinking water abstraction sites. The use of  
540 water from this source, according to current law (Brasil, 2005) must preserve the quality of  
541 public supply after conventional treatment (flocculation, filtration and chlorination).

542 Hence this study looked at the presence of contaminants at drinking water abstraction  
543 sites, defining the sources and mutagenic effects of these stressors as a quality parameter for  
544 the ecosystem and possible reflections on human health.

## 545 **2. Materials and methods**

### 546 **2.1. Study area**

547 The study was performed in the lower portion of the Taquari River belonging to the  
548 Taquari-Antas River Basin located in the state of Rio Grande do Sul-Brazil between  
549 coordinates 28°10'S to 29°57'S and 49°56'W to 52°38'W. The total area of this river is  
550 2,640,930.40 ha and the area of interest covers 292,555.70 ha comprising the sub-basins of  
551 Sampaio/Estrela stream and the Lower Taquari (RS, 2012). Sediment and water quality were  
552 taken into account focusing on drinking water abstraction areas of four regions in the basin  
553 (Figure 1).

554 Based on CONAMA Resolution n° 357/2005 (Brasil, 2005), establishing water  
555 quality standards and limits of different uses, the Taquari-Antas River Basin Committee, in  
556 2012 (RS, 2012) evidenced that the quality of the Lower Taquari is currently compatible with



557 class 4 (a class that is not adequate for drinking water), aiming at the classification for 10  
558 years in class 3 (for watering animals and water supply for human consumption after  
559 conventional or advanced treatment ) and in 20 years time to class 2 (to be used to protect the  
560 aquatic communities and human consumption supply after conventional treatment).  
561 Conversely the Sampaio/Estrela stream sub-basin, whose quality of life is currently  
562 compatible with class 3, in the administrative ruling for 10 years must maintain class 3 and, in  
563 20 years time, class 2. These classifications are based on the levels of quality to meet future  
564 needs defined by society.

565 Evidence of contamination in the Taquari river sediment was found at various  
566 locations around the contaminated area with environmental damage due to wood  
567 preservatives (with pentachlorophenol, creosote and chrome copper arsenate - CCA), and  
568 acknowledged toxic and genotoxic action, which underwent the first stage of removal of these  
569 contaminants (Appel et al., 2007; Costa et al., 2012; Gameiro et al., 2018a; Pohren et al.,  
570 2012). Among the areas evaluated, two places were used for drinking water abstraction  
571 Ta006, located at General Câmara, 4 km downstream from the contaminated site and Ta032,  
572 21 km upstream from this site, outside its influence area. This region has been investigated in  
573 recent years in a program developed by the FEPAM (Environmental Agency of the State of  
574 Rio Grande do Sul) and the Post Graduate course in Ecology Program (UFRGS).

575

576

577

578

579

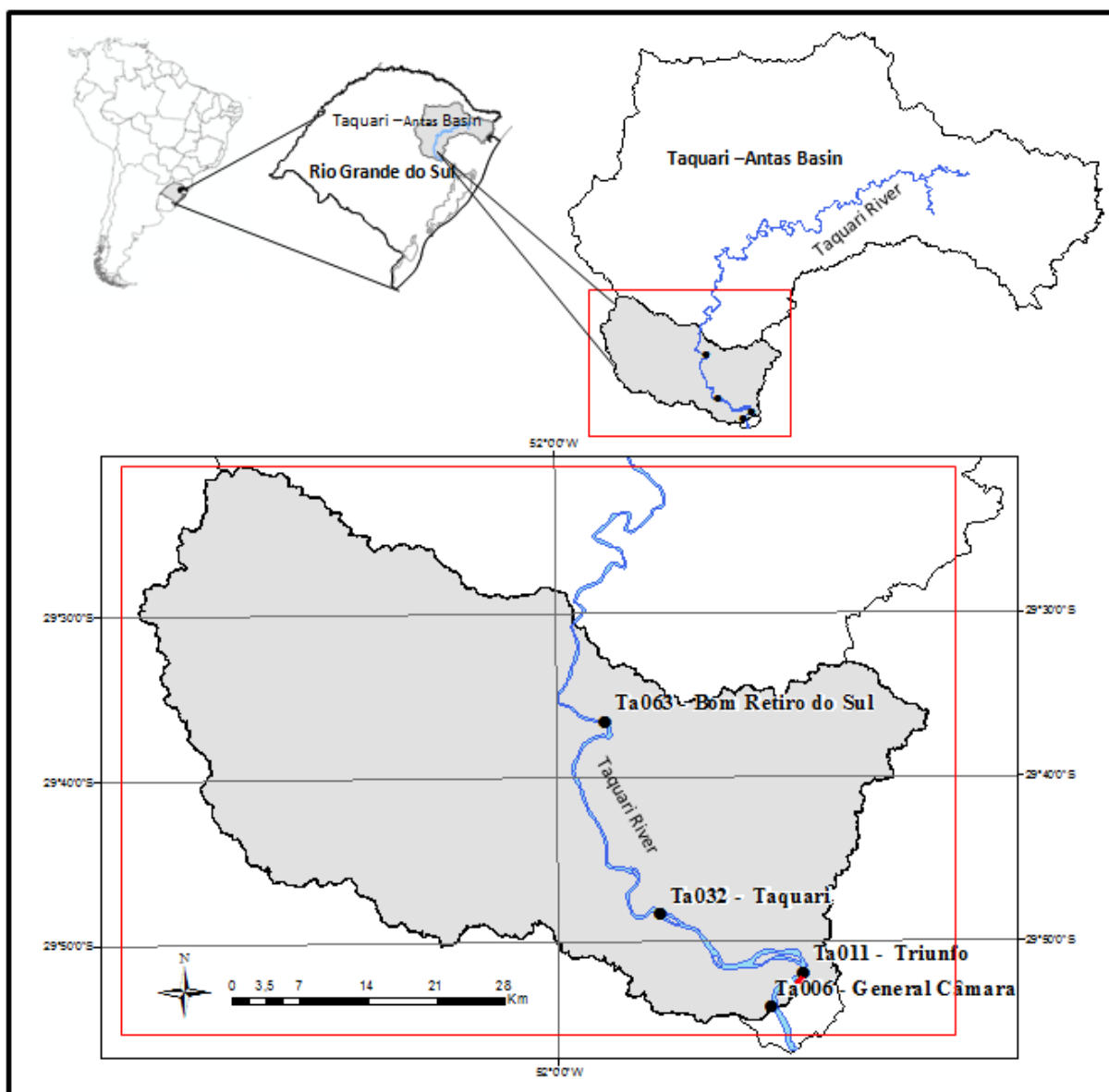
580

581           **2.2. Sampling Sites**

582           The water and sediment samples were collected in the central region of the state,  
583 covering the following municipalities: Bom Retiro do Sul, Taquari, Triunfo and General  
584 Câmara where there are abstraction areas for public water supply located on the Taquari River  
585 (Figure 1). These places were named with the initial letters of the river (Ta) followed by the  
586 number of kilometers away from the mouth:

- 587 • Ta063 (29°36'36,62"S e 51°56'36,04"W) – Located in the Sampaio/Estrela stream sub-  
588 basin in Bom Retiro do Sul city and 12.8 km downstream from the mouth of Sampaio  
589 Stream;
- 590 • Ta032 (29°48'21,86"S e 51°52'50,86"W) – Located on the Lower Taquari, at Taquari city;
- 591 • Ta011 (29°51'58,5"S e 51°42'55,82"W) – Located on the Lower Taquari, at Triunfo city -  
592 Barreto district, 1 km upstream from a site contaminated by wood preservatives;
- 593 • Ta006 (29°54'3,10"S e 51°45'9,30"W) – Located on the Lower Taquari, at General  
594 Câmara city.

595           The study area comprises municipalities that do not report the existence of domestic  
596 sewage treatment plants.



597  
 598 **Figure 1.** Study area located in the lower part of the Taquari River and sampling sites in front  
 599 of the abstraction pump for water supply. The sites were named using the initial letters of the  
 600 river (Ta).  
 601

602 **2.3. Geographic Analysis of the area influenced by the sources of pollution**

603 The area studied was divided into four sub-basins, according to the sampling sites.  
 604 Afterwards these sub-basins were delimited using contour lines corresponding to the areas  
 605 that drain into each of the sites of interest. In order to delimit the area drained by collection  
 606 site, a digital cartographic basis for hydrography and altimetry was used, on an original scale

607 of 1:50,000 (Hasenack & Weber, 2010) to vectorize the dividing line of the sub-basins on the  
608 screen.

609 The sub-basin data were combined with a map of land use and cover, base-year 2009  
610 (Weber et al., 2016), to evaluate the possible contribution of the types of land use and cover  
611 about the results of the contamination observed at each collection site. According to  
612 Hasenack & Cordeiro (2006), most of the original vegetation of this region has already been  
613 altered because it has been settled for a long time. More recently, the plantations of  
614 eucalyptus, black wood acacia, maize, soy and cassava crops, among others, and the  
615 cultivation of rice in wetlands, and urbanization itself greatly modified the original vegetation  
616 (FEPAM, 2010). The occupied surface was classified and quantified as: contaminated area (in  
617 the Barreto/Triunfo District); dry agriculture (dry areas); irrigated agriculture (rice);  
618 grassland; urban area; native forest; silviculture; crops in small plots; wetland and water.

619 In these activities, the Cartalinx vectorial editing software (Clarklabs© and the  
620 Geographic Information System (GIS) software, Idrisi (Clarklabs©) and ArcMap (ESRI©)  
621 were used.

#### 622 **2.4. Sample Collection**

623 The water and sediment samples to characterize the different regions were collected  
624 during the period from 05/08/2015 to 05/10/2015, by the FEPAM sampling team, according  
625 to the schedule for monitoring the water quality in drinking water abstraction areas in Taquari  
626 River. The surface sediment was collected at shallow sites, approximately 20 cm from the  
627 river banks using a Petersen grab (APHA, 1992). The samples were transported to the  
628 laboratory under refrigeration, homogenized, sub-divided into fractions to prepare organic and  
629 inorganic extracts, besides aliquots for tests of the *in natura* samples. After this, all aliquots  
630 were kept in a freezer (-20 °C), until the assays or the extractions were performed.

631 The water samples were collected according to APHA, (1992) described in Vargas et  
632 al. (1993), and 50 L of surface water were sampled per site, close to the abstraction pump for  
633 the water from the river for the treatment plant. These samples were transported under  
634 refrigeration and stored at 4 °C for at most 60 days, the time needed to perform the different  
635 phases of organic compound extraction and the different assays.

## 636 **2.5. Organic extracts**

637 Sediment organic compounds were extracted by sonication (THORNTON — power  
638 1800 W) 50 g of the sample and 100 mL of with dichloromethane solvent for each of four  
639 cycles (DCM—CASRN 75-09-2), aiming to obtain moderately polar fractions as described in  
640 Vargas et al., (2001) and Tagliari et al., (2004). The extracts were then prefiltered in a  
641 chromatographic column, a glass column containing sodium sulfate and celite, and then  
642 concentrated at 15 mL in a rotary evaporator (40 °C). The extracted organic matter  
643 (EOM) was determined on an analytic balance. These extracts were used for mutagenicity  
644 tests and PAHs analysis.

645 The organic extracts of water were obtained beginning with 50 L per site, by adsorption in  
646 Amberlite XAD<sub>4</sub> type resins (1 mL/L of sample), in natural pH and acidified by the addition  
647 of HCl up to pH 2.0 according by Pereira et al., 2007. The XAD<sub>4</sub> resin was pre-washed using  
648 methanol (CASRN, 67-56-1). Then it was inserted into a chromatographic column treated  
649 with the solvents methanol (CASRN, 67-56-1), ethyl ether (CASRN 60-29-7),  
650 dichloromethane (DCM, CASRN, 75-09-2) and ultrapure water (1:1:2:3) according to the  
651 sample pH. The water went through the chromatographic column through a vacuum closed  
652 system (de 100 mL/min flow). The elution of the compounds in natural pH was performed in  
653 methanol/dichloromethane (1:4) removing the moderately polar and nonpolar compounds.  
654 Acid elution was performed in methanol/ethyl acetate (CASRN 141-78-6), for polar

655 compounds. The eluates were concentrated in a rotavapor until a volume of 10 mL. These  
656 extracts were used for mutagenicity tests.

657 These concentrated extracts were placed in graduated flasks at -20 °C and at the time of  
658 the test the solvents in the samples were evaporated under nitrogen flow and then resuspended  
659 in spectrophotometric grade dimethylsulfoxide (DMSO—Riedel-de Haën, CASRN 67-68-5).

## 660 **2.6. Bioassays**

### 661 **2.6.1. *Salmonella*/microsome assay**

662 The *Salmonella*/microsome assay was used to evaluate the mutagenic and cytotoxic  
663 activity of sediment and water organic extracts, using the microsuspension protocol developed  
664 by Maron & Ames (1983); Kado et al. (1986); Vargas et al. (1993). The TA98 and TA97  
665 strains were used to detect frameshift mutagens, and the latter are more sensitive to heavy  
666 metals (Levin et al., 1982; Pagano et al., 1992); TA100 strain that characterizes base pair  
667 substitution; YG1041 (derived from TA98) and YG1042 (derived from TA100), sensitive to  
668 nitroarenes and aromatic amines (Hagiwara et al., 1993). The assays were performed in the  
669 presence and absence of metabolic activation (S9). In sediment samples the microsomal  
670 fraction of Sprague-Dawley rat liver (4%) pre-treated with AROCLOR 1254 (acquired in  
671 lyophilized form—Moltox, USA) is used and in water a mixture of human liver cells (Pooled  
672 Human liver S9 - Moltox, USA).

673 The concentrations of sediment extract utilized in the tests were 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20, 40  
674 and 80 µg equivalent to the dry mass of sediment and in organic extracts of water volumes 50,  
675 100, 200, 500 and 750 mL equivalent per L of sample in duplicate assays. In all assays liquid  
676 nutrient medium and the solvent DMSO were utilized as negative controls. Positive controls  
677 used were sodium azide, (SAZ – CASRN 26628-22-8, Merck do Brasil) and 4-  
678 nitroquinoline-1-oxide (4NQO, CASRN 56-57-5, Sigma Chemical Company) in assays

679 without S9, and 2-aminofluorene (2AF CASRN 153-78-6, Sigma Chemical Company) and 2-  
680 nitrofluorene (2NF, CASRN. 607-57-8, Merck do Brazil) with S9.

681 The negative and positive controls are in the range observed in the historical data of the  
682 laboratory, for negative control (5  $\mu$ L DMSO/plate) –S9:  $39 \pm 9.1$  (TA98),  $121 \pm 44.0$   
683 (TA97a),  $85 \pm 4$  (YG1041),  $199 \pm 70$  (TA100),  $112 \pm 8$  (YG1042) rev/plate (revertants/plate);  
684 +S9:  $33 \pm 5.3$  (TA98),  $102 \pm 27.2$  (TA97a),  $156 \pm 34.4$  (TA100); Positive control, – S9:  
685 4NQO (0.5  $\mu$ g/plate)  $239 \pm 69.6$  (TA98),  $567 \pm 90.5$  (TA97a) and AZS (5  $\mu$ g/plate)  $1009 \pm$   
686  $288.4$  (TA100); +S9: 2AF (10  $\mu$ g/plate)  $221 \pm 33.2$  (TA98),  $431 \pm 23.8$  (TA97a) and  $1334 \pm$   
687  $206.4$  (TA100) rev/plate.

688 The samples were considered positive when the mutagenesis value presented a significant  
689 ANOVA ( $p < 0.05$ ) and a positive dose-response ( $p < 0.05$ ) is observed. The result was  
690 considered indicative when only one of the criteria was observed. The number of rev/plates  
691 was analyzed in the SALANAL program (Analysis of *Salmonella* in Assay, the 1.0 version of  
692 the Research Triangle Institute, RTP, North Carolina, EUA), selecting the linear regression,  
693 Bernstein or lintox models. These values were expressed in number of revertants per gram of  
694 dry sediment (rev/g) or revertants per liter (rev/L) of water sample.

695 Cytotoxic activity was evaluated using the survival curve of the test organism  
696 compared to the different concentrations of samples after 72 hours of incubation. This was  
697 considered positive when the percentage of surviving cells was below 60% of the colonies  
698 compared to the negative control (Vargas et al., 1993).

### 699 **2.6.2. *Allium cepa* assay**

700 The assay was performed using *Allium cepa* seeds evaluating toxicity, cytotoxicity and  
701 genotoxicity, in meristematic cells of roots exposed to the samples of sediments *in natura*  
702 from the four study sites. The assays were performed according to the version of Grant's

703 protocol (Matsumoto et al., 2006). Fifty (50) seeds were exposed on Petri plates, in replicates,  
704 totaling 100 seeds per treatment. The germination was performed at a temperature of  $20 \pm 5^\circ$   
705 C until the seeds reached about 2 cm, in 5 days, and those with a root growth less than the  
706 growth of the negative control were not considered germinated. Then the roots were fixed in  
707 Carnoy (ethanol: acetic acid 3:1). The slides were prepared using the squashing technique and  
708 stained with Feulgen and *Fast Green* counterstain, according to Amaral et al., (2007) with  
709 detailed modifications in Costa et al. (2012). The root region for analysis corresponds to the  
710 final 2 mm close to the hood (Ma et al., 1995; Barbério et al., 2009). Potassium dichromate  
711 ( $K_2Cr_2O_7$ , 2mg/L) was used for positive control of the test and artesian well water for  
712 negative control.

713 The analyses were performed under an optical microscope (x 1000 magnification), 300  
714 cells per slide, totaling 3000 cells per sample (Barbério et al., 2011). The parameters analyzed  
715 in the assay were: (1) cytotoxicity – evaluated by the mitotic index (MI) which takes into  
716 account the number of cells in division/ 1000 cells; (2) mutagenicity – analysis of the  
717 frequency of micronuclei (MN); (3) toxicity – through the germination index (GI) , and the  
718 samples with a GI of less than 60 % of that observed in the negative control are considered  
719 toxic. The results obtained for MI were evaluated by Kruskal Wallis non-parametric  
720 statistical analysis using Bioestat Software reversion 5.0. The MN frequencies were compared  
721 by the Z-test (Zar, 1996) that compares Poisson distributions among samples and negative  
722 control. Significant differences at a level of 5% were considered positive.

### 723 **2.6.3. Fish Embryo Toxicity (FET) assay**

724 The evaluation of the potential acute toxicity of the raw water samples from the study  
725 sites was determined by the exposure of *D. rerio* embryos to the collected samples. The  
726 toxicity assays were performed in the Ecotoxicology Laboratory at the Centro de Ecologia of



727 Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ECOTOX/UFRGS). The embryos used were  
728 generated from wild matrices of the species maintained in the laboratory itself.

729 After fertilization the eggs were transferred to Petri plates containing deionized water  
730 reconstituted to a hardness of 40 - 47 mg.L<sup>-1</sup> of CaCO<sub>3</sub> and pH 7,4 - 7,5 (negative control),  
731 and evaluated under a stereomicroscope with a 70x magnification regarding embryo  
732 development and their viability. The toxicity assays were begun up to 90 minutes after the  
733 eggs were fertilized and followed the determinations of the FET (Fish Embryo Toxicity)  
734 methodology, OECD 236 (OECD, 2013).

735 Approximately 30 eggs were selected and transferred to Petri plates containing each of  
736 the four samples to be evaluated, the negative control and the positive control (4.0 mg/L of  
737 3,4-Dichloroaniline). With the help of the stereomicroscope, the fertilized eggs were  
738 individually transferred to the wells of the respective microplates containing the same  
739 samples.

740 The embryos were observed every 24 hours during 96 hours. For each sampling point,  
741 a microplate with 24 wells containing 2 mL each was used, maintained at 28°C ± 1°C and  
742 with a photoperiod of 15L: 9E. The four end points for seen in the FET method were used as  
743 an indication of the toxic effects: (1) coagulation of fertilized eggs; (2) non formation of  
744 somite; (3) absence of separation between the caudal peduncle and the yolk sac; (4) absence  
745 of heartbeats, considered lethal to the fish.

746 In order to observe the occurrence of late effects on the test-organisms, after the 96-  
747 hour period of exposure foreseen in the methodology, the *D. rerio* larvae were transferred to  
748 250 ml bechers, as a new aliquot of the respective samples and thus kept for another 24 hours.  
749 The statistical analysis of the toxicity data observed was evaluated according to the Exact  
750 Fisher carried in program Toxstat 3.5 (Gulley, 1996).

## 2.7. Chemical Analyses

### 2.7.1. Metals

The analysis to determine metals was performed by the extraction described in the USEPA 3050B method (USEPA, 1996), followed by quantification according to the USEPA 6010C method (USEPA, 2007a). Method 3050B achieves the pseudo-total or bioavailable concentration of metals defined as the fraction of metals weakly linked to the solid phase, excluding the metals linked to the minerals that correspond to the part of the total concentration that can be assimilated or acquired by living beings (Lima et. al, 2006). Cr (VI) was quantified by UV-visible spectrometry, according to USEPA 7196A (USEPA, 1992). And the method for quantification of Hg was based on method 7471B (cold-vapor technique) in a closed system (USEPA, 2007b). The limits of quantification (LOQ) were found in the range of 0.4 to 500 mg/Kg.

In order to evaluate the degree of metal enrichment in the sediments, the levels of reference of CONAMA Resolution Nr 454 (Brasil, 2012) the similar values cited by USEPA (Thomas, 1987) were adopted. The former establishes the levels of material to be dredged (sediment) for elements As, Cd, Pb, Cu, Cr, Hg, Ni and Zn, using as reference the Canadian legislation elaborated by the *Canadian Council of Ministers of the Environment* (CCME 2001). This legislation establishes the guiding values of sediment quality by two levels: TEL (*threshold effect level*) and PEL (*probable effect level*), respectively Level-1 and Level- 2 of the Brazilian Resolution (Brasil, 2012) (Level 1: threshold below which there is less probability of adverse effects on the biota; Level 2: threshold above which there is a greater probability of adverse effects on the biota).

## 2.7.2. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons

775

776 The PAHs species were analyzed in sediment samples, focusing on the 16 species  
777 classified as priority pollutants by USEPA (ATSDR, 2008): benzo(a)pyrene,  
778 dibenzo(ah)anthracene, naphthalene, benzo(a)anthracene, chrysene, benzo(b)fluoranthene  
779 benzo(k)fluoranthene, indene (1,2,3-cd-pyrene), acenaphthylene, acenaphthene, fluorene,  
780 phenanthrene, anthracene, fluoranthene, pyrene and benzo(ghi)perylene. The extraction of  
781 these compounds was based on Method 3550C: Ultrasonic extraction (USEPA, 2007c).  
782 Finally, the cleanup was performed in a silica gel column (CASNR 112926-00-8, VETEC),  
783 hexane/dichloromethane being the volume reduced to 1 ml.

784 The PAHs were quantified by gas chromatography coupled to the  
785 mass spectrometer (GCMS Shimadzu QP2010 by *SIM* — *single ion monitoring*). The  
786 capillarity column used was a DB-5 MS (10 m x 0.10 mm i.d. x 0.10 µm film *thickness*). The  
787 initial temperature of the injector and interface was 310° C. Afterwards, 1 µL was injected in  
788 the splitless mode. The limits of quantification (LOQ) for the 15 PAHs (two of them grouped)  
789 were found in the range of 0.02 to 0.25 µg/g and the coefficient of determination varied from  
790 0.991 to 0.998. The PAHs concentrations were also compared to the guiding values of  
791 sediment quality (Brasil, 2012) of the sites studied.

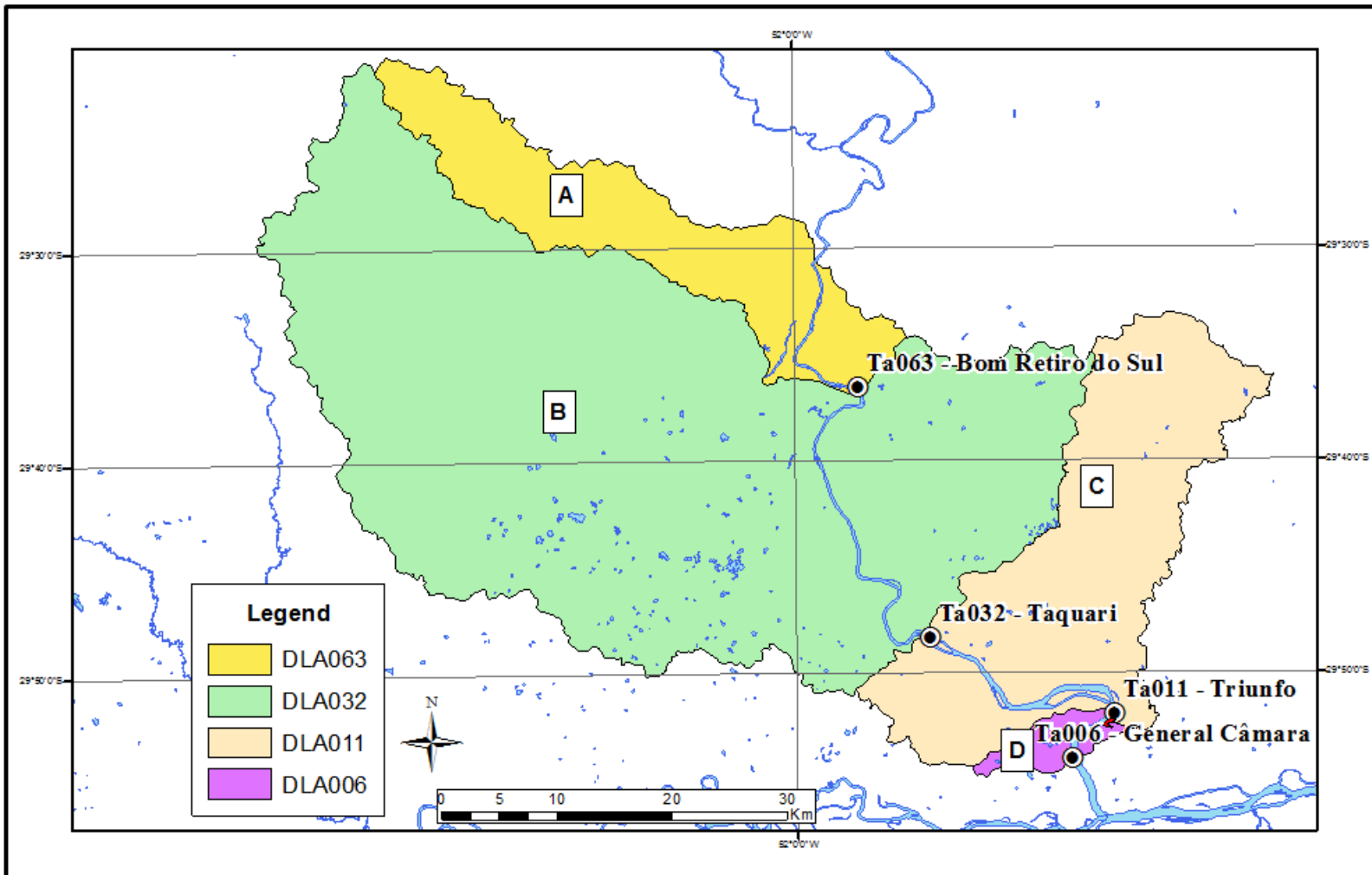
## 792 3. Results

### 793 3.1. Geographic analysis of the area influenced by sources of pollution

794 The delimitation drained areas of each sampling sites were called DLA (Delimited  
795 area) followed by the number of kilometers from the sampling site to the river mouth, as  
796 follows: A = DLA063; B = DLA032; C = DLA011 and D = DLA006 (Figure 2). Using the  
797 delimited areas, it was possible to estimate that the largest sub-basin is site Ta032, with

798 195,721.83 ha, followed by Ta011 with 57,393.56 ha; Ta063 with 35,667.38 ha and Ta006  
799 with 3,772.93 ha.

800 The data characterizing the region of the study indicated different types of land use  
801 and land cover that are presented in Figure A.1. This map was derived from Cordeiro &  
802 Hasenack (2009), who mapped the current plant cover of Rio Grande do Sul state. Table A.1  
803 shows the predominance of the crops in small plots, occupying 58.39% of the territory,  
804 followed by native forest, which occupies 11.23% and grassland 10.43%. Specifically, in the  
805 DLA063 sub-basin the largest areas comprised crops in small plots (73.48 %) and native  
806 forest (14.34 %), although the latter were farther away from the Taquari River (Figura A.1).  
807 Closer to the river there were uses corresponding to silviculture (1.63 %) and irrigated  
808 agriculture (0.68 %). In the DLA032 there was an outstanding predominance of crops in small  
809 plots (58.33 %) and irrigated agriculture, which is represented by the irrigated rice that  
810 corresponds to about 11.61% of the sub-basin territory. These were found in areas close to the  
811 collection site, except for native forest (11.82 %) whose largest areas were located farther  
812 away from the river. At DLA011 crops in small plots (51.27 %), grassland (15.25 %) and  
813 silviculture (13.30 %) were observed. Finally, at DLA006 the following classes: grassland  
814 (27.36 %), crops in small plots (27.09 %) and silviculture (10.54 %) were found very close to  
815 the Taquari River, besides the contaminated area in the Barreto District at Triunfo, which  
816 formerly had soil contaminated by wood preservative proved and studied in the last few years  
817 (Pohren et al., 2012).



818  
 819 **Figure 2.** Delimitation of the areas according to the drainage of the relief in relation to a sampling site, A = DLA063; B =  
 820 DLA032; C = DLA011 and D = DLA006. DLA = Delimited area and the numbers show the distance from the mouth in  
 821 kilometers.

822 Besides the data on land use and cover, a survey was performed of the activities  
823 licensed and registered at FEPAM in the municipalities where the collection sites are located.  
824 This survey helped get to know the type of impact on these areas together with data already  
825 obtained in Gameiro et al., (2018a) (Table A.2). The predominance of agriculture with a  
826 medium and high pollution potential was observed, and also the presence of HPP and MPP  
827 industries around some sites. In the regions of sites Ta063 and Ta032, although there were  
828 many agricultural activities, in areas closer to these sites there are outstanding industries  
829 manufacturing chemical products, tannery and meat packing (HPP), footwear and foodstuffs  
830 (MPP), production of vectors/pest control (HPP), and also pesticide storage (HPP) and poultry  
831 farms (MPP). Ta011, located 1 km upstream is a site contaminated by wood preservatives,  
832 that has undergone the first stage of intervention (Gameiro et al., 2018a) and close to a  
833 petrochemical complex ( $\pm 30$  Km). However, the design tool for the sub-basins allowed  
834 identifying that this area is located at DLA006, and thus influences sampling site Ta006 (red  
835 in Figure A.1), which also receives a great contribution from agricultural contamination.

## 836 **3.2. Sediment results**

### 837 **3.2.1. *Salmonella*/microsome assay in organic extracts**

838 The mutagenesis results of organic sediment extracts indicated a predominance of  
839 direct-acting contaminants without metabolic activation (-S9), which caused both frameshift  
840 (TA98 and TA97a) and base pair substitution (TA100) mutations (Table 1). The sum total of  
841 the significant responses for the different strains highlighted site Ta032, in the city of Taquari,  
842 with higher responses,  $1987 \pm 285.4$  rev/g for TA100-S9 and  $74 \pm 34.4$  rev/g for TA98-S9. In  
843 the areas of the other municipalities, mutagenesis was lower at Ta063 ( $25 \pm 12.9$  rev/g for  
844 TA97a+S9); Ta011 ( $160 \pm 32.4$  rev/g for TA98-S9 and  $16 \pm 6.2$  rev/g for TA97a+S9) and

845 Ta006 (198±19.8 rev/g for TA97a-S9). The assays performed with strains YG1041 and  
 846 YG1042 were negative, ie., no nitrocompounds were found in the samples evaluated (data not  
 847 shown). The results were analyzed using the linear models and Bernstein (Bernstein et al.,  
 848 1982), in the dose-response curves, considering the dosages non cytotoxic with cellular  
 849 growth above 60%. The first cytotoxic dosage of each assay condition for the different sites  
 850 is shown in Table 1, indicating that the direct-acting compounds also contributed to the  
 851 cytotoxicity site Ta032 and Ta011.

852

853 **Table 1.** Mutagenic and cytotoxic responses of organic sediment extracts (revertants/g  
 854 equivalents of dry sediment) in the presence and absence of S9 fraction of rats at the sampling  
 855 sites of Taquari River in the four municipalities investigated.

Sample	TA98		TA97a		TA100		Mutagenic potency	<sup>a</sup> Cytotoxicity	
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9		-S9	+S9
Ta063 <sup>b</sup>	ns	ns	ns	25±12.9 <sup>i</sup>	ns	ns	25	nc	nc
Ta032	74±34.4 <sup>i</sup>	ns	ns	ns	1987±285.4	ns	2061	40	Nc
Ta011	160±32.4	ns	ns	16±6.2 <sup>i</sup>	ns	ns	176	40	Nc
Ta006	ns	ns	198±19.8	ns	ns	ns	198	nc	40

856 a: First dosage cytotoxic in g of dry weight of sediment with dosage cellular survival is less  
 857 than 60% of negative control;

858 b: The sites were named using the initial letters of the river (Ta) followed by the number of  
 859 kilometers from the mouth;

860 ns - non significant.;

861 nc - Noncytotoxic;

862 i: indicative values of mutagenicity.

863

864

865

### 3.2.2. *Allium cepa* assay: sediment *in natura*

866 The responses of the analyses of micronuclei, germination and mitotic indices are  
 867 presented in Table 2. The values obtained both for the MI and for GI were negative. However,  
 868 it should be underscored that samples Ta063 and Ta006 presented higher GIs than the

869 negative control and may be related to a greater availability of micronutrients contained in the  
 870 organic matter of these sediments than those available in well water. This increase also  
 871 occurred in the positive control that contains potassium, a nutrient needed by plants in  
 872 relatively high amounts which acts, among other functions, on root growth. This result does  
 873 not interfere in the genotoxic evaluation that requires root growth and cell division to detect  
 874 genetic damage.

875 The analysis of micronuclei showed a significant different in relation to the negative  
 876 control for sample Ta032 (Table 2). Indicative values of mutagenicity were also found in the  
 877 samples from Ta063 and Ta006, (values twice the size of those of the negative control but  
 878 that did not attain statistical significance).

879 **Table 2:** Toxicity, cytotoxicity and genotoxicity of sediment samples from the Taquari River  
 880 in areas from the abstraction of drinking water in the *Allium cepa* test.

SAMPLE	GI%	MI/1000	MN/3000
NC	100	3,2	3
PC	136	7,0	17***
TA063 <sup>a</sup>	136	4,7	7 <sup>i</sup>
TA032	97	3,4	13***
TA011	97	3,9	1
TA006	125	5,9	6 <sup>i</sup>

881 GI- germination index- percentage related to NC - negative control (artesian well water); PC-  
 882 positive control (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, potassium dicromate, 2 mg/L); MI-mitotic index = cells in  
 883 division/1000 X 100; MN – numbers of micronuclei counted in 3000 cells. \*\*\*= significant at  
 884 p ≤ 0,001; i= indicative response (two times higher than the negative control value without  
 885 statistical significance).

886 a: The sites were named using the initial letters of the river (Ta) followed by the number of  
 887 kilometers from the  
 888 mouth.

889  
 890  
 891  
 892  
 893  
 894  
 895  
 896  
 897



898

### 3.2.3. Chemical analysis

899 The analysis of heavy metals in sediments of the Taquari River followed a descriptive  
 900 approach and the data were compared to international (CCME, 2001) and national laws  
 901 (Brasil, 2012). No significant spatial variation was found in most of the heavy metal contents  
 902 between kilometers 63 (Ta063) and the neighborhood of the mouth (Ta006) (Table 3).

903

904 **Table 3.** Taquari River sediment metals values at the four drinking water abstraction sites.

Metal (mg/Kg)	Ta063 <sup>a</sup>	Ta032	Ta011	Ta006	LOQ
Al	32992	34712	40318	37896	125
Sb	4.1	4	3.9	4.1	0.5
As	<2.5	<2.5	<2.5	<2.5	2.5
Ba	255	235	221	228	2.5
Be	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	0.5
B	<1	<1	<1	<1	1
Cd	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	0.5
Pb	4.8	6.6	7.6	9.8	2.5
Co	16.5	16.2	19.6	19.8	2.5
Cu	43.2	47.5	59.6	60.4	2.5
Cr	31.2	27.4	27.2	26.5	2.5
Cr (VI)	<0.4	<0.4	<0.4	<0.4	0.4
Cr (III)	31.2	27.4	27.2	26.5	2.5
Se	<2	<2	<2	<2	2
Fe	22541	22387	22414	22876	125
Mn	448	543	782	610	2.5
Hg	<0.15	<0.15	<0.15	<0.15	0.15
Mo	<2.5	<2.5	<2.5	<2.5	2.5
Ni	21.6	19	19.4	17.7	2.5
Ag	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	0.5
Se	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	0.5
Na	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	500
V	133	137	127	140	2.5
Zn	66.9	70	81.1	85	2.5

905 LOQ – The limits of quantification in mg/Kg.

906 a: The sites were named using the initial letters of the river (Ta) followed by the number of  
 907 kilometers from the mouth.

908

909 According to the laws, the guide-values obtained for Cu (all sites - Ta063 = 43.2  
 910 mg/Kg; Ta032 = 47.5 mg/Kg; Ta011 = 59.6 mg/Kg; Ta006 = 60.4 mg/Kg) and Ni (Ta063 =  
 911 21.6 mg/Kg; Ta032 = 19 mg/Kg; Ta011 = 19.4 mg/Kg) were situated between the minimum  
 912 level for the occurrence of effects (TEL – Cu = 35.7 mg/Kg and Ni = 18 mg/Kg) and the level

913 with a probability of occurrence of effects that are harmful to the biota (PEL – Cu = 197  
914 mg/Kg and Ni = 35.9 mg/Kg).

915 The concentration of the sixteen PAHs considered a priority by USEPA (ATSDR,  
916 2008) was analyzed, and seven of them were classified by the International Agency for  
917 Research on Cancer (IARC, 2010) as: group 1 (carcinogenic to man: benzo(a)pyrene), group  
918 2A (probably carcinogenic to man: dibenzo(ah)anthracene) and group 2B (possibly  
919 carcinogenic to man: naphthalene, benzo(a)anthracene, chrysene, benzo(b)fluoranthene  
920 benzo(k)fluoranthene, indene (1,2,3-cd-pyrene). The sum total of the concentration of these  
921 compounds was low in the four regions, with greater evidence at Ta011 (0.0925 µg/g),  
922 followed by Ta032 (0.0426 µg/g) (Table 4). In addition, the PAHs contents of each site  
923 sampled were also compared to the guide-values of sediment quality (Brasil, 2012; CCME,  
924 2001) and the results showed that only site Ta011 (92.5 µg/kg – change of unit to compare  
925 with the legislation) presented a value between TEL (31.9 µg/kg) and PEL (782 µg/kg) for  
926 benzo(a)pyrene, indicating that occasionally effects on the biota are expected (Table 4).

### 927 **3.1. Water results**

#### 928 **3.1.1. *Salmonella*/microsome assay in organic extracts**

929 The mutagenic potency of the water extracts in the presence and absence of human S9 is  
930 shown in the Table 5. Significant results predominated for strain TA100 and were found  
931 at two of the four sites studied, Ta063 and Ta011. Site (Ta063) presented higher values  
932 for direct mutagenesis in acid pH (1066±27.2 rev/L) and natural pH (647±81.8 rev/L)  
933 and in the latter sample the significant response persisted in the presence of metabolic  
934 activation (274±74 rev/L).

935 At Ta011, the results showed a predominance of mutations caused by agents that need  
936 metabolic activation to be expressed. In strain TA100+S9, 618±65 rev/L were found in the

937 sample of natural pH and 566±66 rev/L in the acid one. Although with a reduced value,  
 938 mutagenesis was also found with TA98+S9 (24±10.6 rev/L). The extracts of Ta032 and  
 939 Ta006 were not mutagenic and no sample was cytotoxic.

940

941 **Table 4.** Concentration of sixteen priorities PAHs<sup>1</sup> analyzed in organic sediment extract  
 942 from drinking water abstraction sites on the Taquari River.

PAHs (µg/g)		Ta063 <sup>5</sup>	Ta032	Ta011	Ta006	LOQ	TEL <sup>2</sup> Level 1 (µg/g)	PEL <sup>2</sup> Level 2 (µg/g)	TEL <sup>3</sup> Level 1 <sup>4</sup> (µg/kg)	PEL <sup>3</sup> Level 2 <sup>4</sup> (µg/kg)
Carcinogenics PAHs	benzo(a)pyrene	0.0150	0.0275	0.0574	0.0098	0.02	0.031	0.782	31.9	782
	Benzo(b+k)fluoranthene	ND	ND	ND	0.0065	0.02	-	-	-	-
	Chrysene	0.0001	0.0001	0.001	0.0006	0.02	0.057	0.862	57.1	862
	Indene (1,2,3-cd-pyrene)	ND	ND	ND	ND	0.02	-	-	-	-
	Benzo(a)anthracene	0.0001	0.0003	0.0005	0.0003	0.02	0.031	0.385	31.7	385
	Dibenzo(ah)anthracene	ND	ND	ND	ND	0.02	0.006	0.135	6.22	135
	Naphthalene	0.0037	0.0083	0.0118	0.0064	0.02	0.034	0.391	34.6	391
Others PAHs	Pyrene	0.0003	0.0015	0.0085	0.0033	0.02	0.053	0.875	53	875
	Fluoranthene	0.0002	0.0004	0.0028	0.0011	0.02	0.111	0.235	111	2355
	Benzo(ghi)perylene	ND	ND	ND	ND	0.02	-	-	-	-
	Phenanthrene	0.0009	0.0026	0.0071	0.0034	0.02	0.041	0.515	41.9	515
	Fluorene	0.0006	0.001	0.0015	0.001	0.02	0.021	0.144	21.2	144
	Anthracene	0.0009	0.0001	0.0004	0.0003	0.02	0.046	0.245	46.9	245
	Acenaphthylene	ND	ND	ND	ND	0.02	0.005	0.128	5.87	128
<b>Total</b>	<b>0.0223</b>	<b>0.0426</b>	<b>0.0925</b>	<b>0.0336</b>						

943 ND – Not detected. TEL (threshold effect level) and PEL (probable effect level), respectively Level-  
 944 1 and Level- 2 of the Brazilian Resolution (Level 1: threshold below which there is less probability of  
 945 adverse effects on the biota; Level 2: threshold above which there is a greater probability of adverse  
 946 effects on the biota). Bold: values between TEL and PEL. <sup>1</sup>USEPA (ATSDR, 2008); <sup>2</sup> PAHs  
 947 concentrations referred to in the legislation (CCME, 2001; Brazil, 2012) converted to µg / g for  
 948 comparison; <sup>3</sup> (CCME, 2001); <sup>4</sup> (Brasil, 2012).

949 <sup>5</sup>: The sites were named using the initial letters of the river (Ta) followed by the number of  
 950 kilometers from the mouth.

951

952

953 The information on the extracted organic matter (EOM) from the water extracts  
 954 showed that site TA063 presented the most matter (14690 µg/mL) extracted both at a natural  
 955 pH (N=8720 µg/mL) and an acid pH (A=5970 µg/mL). The values of EOM from the other  
 956 areas studied were in decreasing order: Ta006: N=1420 and A= 2270 µg/mL; Ta011: N=1040  
 957 µg/mL and A=1320 µg/mL; Ta032: N= 430 µg/mL and A=1320 µg/mL. It should be  
 958 considered that the organic compounds were extracted from a large volume of sample (50 L),  
 959 which thus allows the absorption of a larger concentration of substances in the final extract.  
 960 However, the EOM of the sediment extracts showed an inverse order and at site Ta032 the  
 961 largest concentration of moderately polar compounds (210 µg/mL), followed by Ta011 (90  
 962 µg/mL), Ta006 (60 µg/mL) and Ta063 (50 µg/mL).

963  
 964 **Table 5.** Summary of the results obtained in the *Salmonella*/microsome assay in surface water  
 965 samples in the presence and absence of human S9 at different abstraction sites for supply in  
 966 Taquari River, expressed in revertants per liter (rev/L) of water sample.

Sample	TA98				TA100				Mutagenic potency
	-S9		+S9		-S9		+S9		
	N	A	N	A	N	A	N	A	
Ta063 <sup>b</sup>	ns	ns	ns	ns	647 ±81.8	1066 ±27.2	274±74	ns	1987
Ta032	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Ta011	ns	ns	ns	24±10.6	ns	ns	618±65	566±66	1208
Ta006	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

967 a: First dosage cytotoxic in g of dry weight of sediment with dosage cellular survival is less  
 968 than 60% of negative control;

969 b: The sites were named using the initial letters of the river (Ta) followed by the number of  
 970 kilometers from the mouth.

971 ns - non significant.;

972 nc - Non cytotoxic;

973 N: natural pH

974 A: acidic pH

975

976

977 **3.1.2. Fish Embryo Toxicity (FET) assay: water *in natura***

978 Based on the results observed in raw water samples, acute toxicity assays performed with  
979 the *D. rerio* embryos did not present, after the exposure period of 96 hours, statistically  
980 significant differences ( $\alpha=0.05$ ) between the mortalities observed in the samples  
981 compared to the control groups. After the assay was extended for another 24 hours, now in the  
982 form of larvae, it was also not possible to observe statistically significant differences between  
983 the mortality observed in the control group and the samples evaluated according to Fisher's  
984 exact test.

985 **4. Discussion**

986 This study attempted to investigate sources of toxic and genotoxic compounds, routes and  
987 contaminants dispersion that reach the Taquari River. Initially the GIS tools delimited the  
988 sub-basins of the four sites of interest and verified the possible sources of contamination. The  
989 sediment and surface water samples were evaluated regarding the presence of mutagenic  
990 compounds including analyses of the main chemical stressors already defined in previous  
991 studies (Costa et al., 2012; 2017; Gameiro et al., 2018a). Although site Ta063 was classified  
992 as the one with the best quality in the study area, the analysis of use and land cover showed  
993 that the DLA063 sub-basin has the largest area of activities involving agriculture.  
994 Furthermore, the presence of industries with a high and medium potential for pollution was  
995 identified close to the sampling area (manufacture of chemical products, tannery and meat-  
996 packing, footwear and food). These activities call attention to the quality of water supplied to  
997 the population. At the other sites, the predominant activities are related to agriculture (surface  
998 irrigation and silviculture and livestock), although there is industrial activity (production of  
999 controls of vectors/pests, agricultural pesticide deposits, petrochemical complex) and sand  
1000 mining.

1001 The *Salmonella* strains were sensitive to direct action mutagenesis in sediment and water  
1002 extracts, and the mutagenesis was higher at TA100 in sediment samples. Site Ta032 presented  
1003 the highest responses, both for base pair substitution and for frameshift error (Table 1). In the  
1004 organic extracts of water the results were negative. The mutagenic potency of water was  
1005 found only at sites Ta063 (1987 rev/L) and Ta011 (1208 rev/L) detected by TA100 in direct  
1006 assays and measured after metabolic activation with human S9. At Ta063 the predominant  
1007 result was without S9, followed by a reduction in the presence of S9 (Table 5). The difference  
1008 between mutagenic activity with direct action and activated by S9 may help identify sources  
1009 of contamination. Some authors suggest that the presence of direct-acting compounds may be  
1010 attributed to natural sources (Chen & White, 2004). Loper (1984) suggested that the direct-  
1011 action mutagenesis detected by TA100 or both, TA100 and TA98, that decreases in the  
1012 presence of S9, is not related to industrial or agricultural activity. Other authors also reported  
1013 the presence of direct genotoxic activity in particles in suspension in water and in sediments  
1014 from sites that were not affected by urban, industrial or municipal discharges (Grabow et al.,  
1015 1980; White et al., 1998). Although our results have been similar for mutagenesis, it was  
1016 possible to observe in the geographic analyses that the sub-basin at site Ta063 has an  
1017 upstream contribution from anthropic activities of large urban centers and suggests a  
1018 prevalence of direct-acting mutagens.

1019 The mutagenesis of the water extracts at Triunfo (Ta011) was detected by strains  
1020 TA98 and TA100 in the presence of S9. Compounds depending on metabolic activation are  
1021 related to activities from anthropic sources, especially industrial sources, domestic and  
1022 agricultural effluents (Loper, 1984; Houk, 1992; Chen & White, 2004). The results of sites  
1023 Ta063 and Ta011, presented a classification as “moderate” (from 500 to 2500 rev/L) for  
1024 mutagenic activity of TA100 with and without S9, considering the worldwide overview of  
1025 surface water quality monitoring (Umbuzeiro et al., 2001; Ohe et al., 2004). According to Ohe

1026 et al. (2004) established a relation of positive and negative samples for TA98 and TA100 in  
1027 the absence and presence of S9. Among all the data analyzed, the percentage of samples for  
1028 TA98 was approximately 15%, both in the absence and presence of S9. On the other hand, the  
1029 results for TA100, under the same assay conditions, were 7%. These observations suggest the  
1030 predominance of frameshift compounds (TA98) in surface waters worldwide, differently from  
1031 the evidence observed in the present study. This evidence of mutagenesis observed in organic  
1032 extracts obtained from large volumes of water, did not result in significant toxic and  
1033 teratogenic effects in relation to bioassays with *D. rerio* embryos and larvae exposed to raw  
1034 water. This may be indicative of the dilution effect of these samples.

1035         The sediment samples from these sites (Ta063 and Ta011) presented lower values for  
1036 mutation in the presence of S9, and this result may be related to PAHs group compounds that  
1037 even at low total concentrations evidenced the presence of the species considered  
1038 carcinogenic (IARC, 2010). A previous study in this region (Gameiro et al., 2018a), also  
1039 indicated that samples with PAHs concentrations below 0.1 µg/g do not present a mutagenic  
1040 response. At Ta011, however, the value of total PAHs was close to this limit (0.0925 µg/g),  
1041 being 0.0707 µg/g for PAHs with a carcinogenic potential, which might justify the presence  
1042 of mutagenicity for the strain TA97a+S9 (16±6.2 rev/g). But, at site Ta063, the mutagenesis  
1043 value similar for strain TA97a+S9 (25±12.9 rev/g) presented a concentration of total PAHs  
1044 less than (0.0223 µg/g with 0.0189 µg/g for carcinogenic). All these results may not be related  
1045 only to PAHs. The complexity of the aquatic environment where other substances may be  
1046 contributing to the mutagenesis found must be considered. The abstraction site at General  
1047 Câmara, Ta006, showed lower values for mutagenesis only in sediments for strain TA97a  
1048 (198±19.8 rev/g). In a previous study (Gameiro et al., 2018a) this site had positive results  
1049 before and an elevation of mutagenesis after the soil intervention in the contaminated area  
1050 (finalized in 2013) at Triunfo (4 Km upstream), indicating the possible contribution of

1051 stressors of this area to the downstream regions. Besides, it should be emphasized that this  
1052 region also has areas where there are agricultural and sand mining activities.

1053         Regarding the analysis of metals in sediment, Cu and Ni were present at the four sites  
1054 studied, at levels that may occasionally generate deleterious effects on the biota according to  
1055 national and international legislation (Brasil, 2012; CCME, 2001). Chen & White (2004)  
1056 reported an increase in direct mutagenesis related to the presence of metal ions. Capra (2014)  
1057 also emphasized a few variables that could contribute to increasing these ions and elevate the  
1058 complexity of the mixture in the aquatic environment, such as the physical-chemical factors  
1059 resulting from the high erosive potential of the basin, dilution or even concentration of  
1060 contaminants present in the solid material transported by the river.

1061         The mutagenesis results of the sediment and water samples indicated the presence of a  
1062 biologically active mixture that induced mutagenic values, reaching up to  $1066 \pm 27.2$  rev/L  
1063 (Ta063), as moderate mutagenesis for water and  $1987 \pm 285.4$  rev/g (Ta032), as highly  
1064 contamination region in the sediment samples (table 1 and 5) (Chen & White, 2004; Ohe et  
1065 al., 2004). However, the concentrations of metals and PAHs, identified in this basin in  
1066 previous studies (Costa et al., 2012; 2017; Gameiro et al., 2018a; 2018b), did not  
1067 satisfactorily explain the presence of mutagenesis observed in sediments. Nitrocompounds  
1068 were not found when the sensitive strains were used in the present study.

1069         The analyses performed on the samples of sediment *in natura* at the four sites by the  
1070 *A. cepa* bioassay showed negative results for the mitotic and germination indices, showing the  
1071 absence of a toxic effect on the germination and cell division. Sample Ta032 presented a  
1072 significant response to the induction of micronuclei. The micronucleus is a parameter used to  
1073 evaluate the mutagenic potential of substances, because is the result of the absence or  
1074 incorrect repair of alterations in the parental cells, being considered an effective and simple  
1075 test for mutagenicity analysis (Pohren et al., 2013). Micronuclei are masses with cytoplasmic



1076 chromatin which appear as small nuclei formed from chromosome fragments in the anaphase  
1077 phase of cell division or due to loss of whole chromosomes; they are induced by agents that  
1078 are able to break the DNA or interfere in fuse formation (Fenech et al., 1999). Samples Ta063  
1079 and Ta006 presented values indicating genotoxicity (MN frequency) in root meristems of *A.*  
1080 *cepa*. This response may suggest the presence of pollutants in the sediment at these sites,  
1081 agreeing with significant responses observed in the *Salmonella*/microsome assay. In the study  
1082 performed by Costa et al. (2012; 2017) site Ta032 also showed significant results for the  
1083 index of chromosomal aberrations and mutagenesis of *A. cepa* in samples of interstitial water  
1084 in sediment. Besides, the authors performed an assay with *Salmonella*/microsome at this site,  
1085 finding significant results for the TA98 strain, without metabolic activation. The associations  
1086 of these results together with those of the present study are in agreement and allow stating the  
1087 presence of different compounds at Ta032, detected by the two bioassays.

1088         Non-point pollution resulting from urban surface runoff is acknowledged as one of the  
1089 main deteriorations causes of the water resources quality (Gnecco et al., 2005; Li et al., 2007)  
1090 During the period before samples were collected to characterize site Ta063, there was high  
1091 pluviosity in the region ( $\pm 30$  mm), according to data extracted at INMET (Instituto Nacional  
1092 de Meteorologia), and this may account for the high mutagenicity values in water samples,  
1093 since the contaminants may have been leached from the soil or groundwater and carried to the  
1094 river. Different responses were found at the other sites, where there was a lower mean rainfall  
1095 in 7 days of the period (1.3 mm), which may have contributed to a greater absorption of  
1096 organic matter with hazardous substances in the sediment particles, found at sites Ta032 and  
1097 Ta011. Some studies showed that the rainwater contains levels of pollution with different  
1098 characteristics and accumulation rates that increase the complexity of chemical interactions  
1099 present in the surface waters (Kim et al., 2005; Ohe et al., 2004; Zhao et al., 2006).

1100 It should also be mentioned that the landscape analysis of the study areas showed large  
1101 extensions areas related to the agricultural activities, effectively exposing these environments  
1102 to the pesticides. The percentages of agricultural areas in sub-basins DLA032 (76.95%),  
1103 DLA063 (75.79 %) and DLA011 (72.53 %) presented a relationship to the mutagenic  
1104 potentials observed at sites TA032 (2061 rev/g in sediment), Ta063 (1987 rev/L in water) and  
1105 Ta011 (1208 rev/L in water). Furthermore, the non- existence or a low mutagenesis found at  
1106 General Câmara (Ta006) may be related to the smaller of agricultural areas at DLA (52.24%).  
1107 The pesticides may produce a variety of toxic side effects, which are a risk to the environment  
1108 (Golfinopoulos et al., 2003). The mutagenic and carcinogenic activities of herbicides,  
1109 insecticides and fungicides in experimental animals have already been reported by Bull et al.  
1110 (2006) and Karabay & Gunnehir (2005). Anjum & Malik (2013) evaluated the mutagenic  
1111 activity of industrial effluents close to the pesticides industry and obtained positive responses  
1112 for TA98 and TA100 with and without S9. They also found the presence of organochlorinated  
1113 and organophosphorated pesticides at concentrations varying from 1.62 to 220 ng/ml,  
1114 highlighting that even at low concentrations it was possible to identify the reported mutagenic  
1115 effects.

1116 In a review of literature Tijani et al, (2016) call attention to the presence of  
1117 micropollutants, also called Emerging Pollutants (EPs), that alter the ecosystems including  
1118 water resources, modifying the composition and reactivity of the mixtures present. The  
1119 occurrence of EPs in the environment is related to the effects of bioaccumulation and  
1120 biomagnification, persistence, toxicity, potential effects of endocrine deregulation, besides  
1121 carcinogenic, mutagenic and teratogenic effects (Guillén et al., 2012). The EPs are present in  
1122 the waters at concentrations that vary from a few nanograms per liter (ng/L) to several  
1123 micrograms per liter ( $\mu\text{g/L}$ ). The EPs consist of endocrine deregulator compounds, by-  
1124 products of disinfection, nanomaterials, veterinary medicines, industrial chemical products,

1125 pesticides, personal use products, and others (Luo et al., 2014; Tijani et al, 2016). The “low  
1126 concentration” and diversity of these compounds not only make them difficult to detect and  
1127 carry out analysis procedures. They also present challenges for legislation, requiring new  
1128 water and sewage treatment processes (Luo et al., 2014), since domestic sewerage is still  
1129 being implemented at the study sites.

## 1130 **5. Conclusion**

1131 The ecological impact of genotoxic substances on aquatic biota is difficult to estimate,  
1132 because after effective exposure to an organism the pollutants depend on a broad variety of  
1133 environmental and biological factors. In *Salmonella*/microsome assays performed on  
1134 sediment and water samples showed the prevalence of direct-acting mutagens at the drinking  
1135 water abstraction sites studied. Site Ta032 had the greatest mutagenic potential in a sediment  
1136 sample, while Ta063 did in the water sample. The testing system in plants, *A. cepa*, was  
1137 sensitive to investigate the genotoxicity of the *in natura* sediment samples and was  
1138 concordant with the widely used and validated *Salmonella*/microsome mutagenicity assay.  
1139 The sub-basins of these sites were larger and through geographic analyses it was found that  
1140 agriculture-related activities predominate, with cultivation of small plots. However, close to  
1141 the collection sites, non-agricultural anthropic areas were found with medium and high  
1142 potentially polluting industries. Site Ta011 had significant responses, both in sediment and in  
1143 water samples, indicating that it also received a higher contribution from agricultural  
1144 activities. Another important aspect is the proximity to the site contaminated by wood  
1145 preservatives, which underwent the first stage of intervention (distance less than 1 km  
1146 upstream). Finally, Ta006 showed the lowest presence of contaminants among the sites  
1147 studied, as a likely consequence of the removal of the main active sources from the  
1148 contaminated soil area, located 4 km downstream. The small contribution from the chemical

1149 groups analyzed to explain the mutagenic potential cause concern as to the possible complex  
1150 mixture of pollutants present at the drinking water abstraction sites. Besides industries and  
1151 agricultural activities close to the abstraction pump, the lack of adequate treatment of  
1152 domestic sewage may also contribute to forming contaminants in the water and sediment.  
1153 Thus, new challenges are created in the scientific community to define methodologies of  
1154 analysis and treatment of these new stressors.

#### 1155 **Author Contributions**

1156 Paula Hauber Gameiro wrote the manuscript with a major intellectual contribution  
1157 from PhD Vera Maria Ferrão Vargas. Kauê Hohn Assis an undergraduate student helped  
1158 perform *Salmonella*/microsome tests and extract the samples. Prof. Dr. Heinrich Hasenack  
1159 helped elaborate the images using GIS tools. Dr. Clarice Torres de Lemos participated in  
1160 guiding the Genotoxicity assays with *Allium cepa* and Dr. Alexandre Arenzon, in the studies of  
1161 FET Ecotoxicity with *Danio rerio*. All the authors approved the final manuscript.

#### 1162 **Acknowledgments**

1163 The authors thank Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior  
1164 (CAPES) for the doctoral fellowship given to Paula Hauber Gameiro and the Conselho  
1165 Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico for the scientific initiation scholarship  
1166 given to Kauê Hohn Assis. We also thank the sample collection group of FEPAM for  
1167 performing the collections. This work was funded by Conselho Nacional de Desenvolvimento  
1168 Científico e Tecnológico (Processos CNPq 307884/2011-2 e CNPq 479566/2012-7).

#### 1169 **6. References**

- 1170  
1171 Amaral, A.M., Barbério, A., Voltolini, J.C., Barros, L. 2007. Avaliação preliminar da  
1172 citotoxicidade e genotoxicidade, da água da bacia do rio Tapanhon (SP- Brasil) através  
1173 do teste *Allium* (*Allium cepa*). Revista Brasileira de Toxicologia. 20 (1 e 2), 65-72.  
1174 Anjum, R., Malik, A. 2013. Evaluation of mutagenicity of wastewater in the vicinity of  
1175 pesticide industry. Environ Toxicol Pharmacol. 35,284–291.

- 1176 APHA. Standart Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public  
1177 Health Association, American Water Works Association and Water Environment  
1178 Federation. 18th eds. M.A.H Franson, Washington, p 1-20, 1992.
- 1179 Appel, J.S.L., Terescova, V., Rodrigues, V.C.B., Varga, V.M.F. 2007. Aspectos toxicológicos  
1180 do preservativo de madeira CCA (arseniato de cobre cromato): revisão. Rev. Bras.  
1181 Toxicol. 19, 29 – 43 (in Portuguese).
- 1182 ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). 2008. Resumende Salud  
1183 Pública—Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos. Aavailable. /http://www.  
1184 atsdr.cdc.gov/es/phs/es phs69.pdf.
- 1185 Barbério A., Barros, L., Voltolini, J.C., Mello, M.L.S. 2009. Evaluation of the cytotoxic and  
1186 genotoxic potential of water from the Brazilian river Paraíba do Sul with the *Allium cepa*  
1187 test. Braz J Biol. 69, 837–842.
- 1188 Barbério, A., Voltolini, J. C., Mello, M.L. S. 2011. Standardization of bulb and root sample  
1189 sizes for the *Allium cepa* test. Ecotoxicology. 20, 927–935.
- 1190 Bernstein, L., Kaldor, J., Mccann, J., Pike, M.C. 1982. An empirical approach to the statistical  
1191 analysis of mutagenesis data from the Salmonella test, Mutat. Res. 97, 267–287.
- 1192 Braunbeck, T., Bottcher, M., Hollert, H., Kosmehl, T., Lammer, E., Leist, E., Rudolf, M.,  
1193 Seitz, N. 2005. Towards an alternative for the acute fish LC50 test in chemical  
1194 assessment: the fish embryo toxicity test goes multi-species—an update. Altex 22 (2),  
1195 87–102.
- 1196 Brasil. 2005. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução CONAMA n° 357 de 17 de  
1197 março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais  
1198 para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento  
1199 de efluentes, e dá outras providências. Aavailable. <http://www.mma.gov.br/conama> (in  
1200 Portuguese).
- 1201 Brasil, 2012. Conselho Nacional do Meio Ambiente - Resolução CONAMA n° 454 de 08 de  
1202 novembro de 2012, data em que entrou em vigor, revogou expressamente a Resolução  
1203 CONAMA n° 344 de 25 de março de 2004, que estabelecia diretrizes gerais e  
1204 procedimentos mínimos para a avaliação do material a ser dragado em águas  
1205 jurisdicionais brasileiras, e dá outras providências. Aavailable.  
1206 <http://www2.mma.gov.br/port/conama> (in Portuguese).
- 1207 Bull, S., Fletcher, K., Boobis, A., Batterrshill, J. 2006. Evidence for genotoxicity of pesticides  
1208 in pesticide applicators. Mutagenesis. 21, 93–103.
- 1209 Capra, M. 2014. Análise espacial da mudança do leito do Rio Taquari entre os municípios de  
1210 Muçum e Arroio do Meio/RS.73 f. Monografia de Conclusão de Curso – Centro  
1211 Universitário Univates, Curso de Engenharia Ambiental, Univates, Lageado, Brasil (in  
1212 Portuguese).
- 1213 Cardozo, T.R., Rosa,D.P., Feiden, I.R., Rocha, J.A.V., Oliveira, N.C.A., Pereira, T.S.P.,  
1214 Pastoriza, T.F., Marques, D.M., Lemos, C.T.L. Terra, N.R., Vargas, V.M.F. 2006.  
1215 Genotoxicity and toxicity assessment in urban hydrographic basins. Mutat Res. 603, 83–  
1216 96.
- 1217 CCME - Canadian Council of Ministers of the Environment. 2001. Canadian sediment quality  
1218 guidelines for the protection of aquatic life: Introduction. Updated. In: Canadian  
1219 environmental quality guidelines, 1999, Canadian Council of Ministers of the  
1220 Environment, Winnipeg.
- 1221 Chen, G., White, P.A. 2004. The mutagenic hazards of aquatic sediments: a review. Mutat.  
1222 Res. 567, 151-225.
- 1223 Claxton, L.D., Matthews, P.P., Warren, S.H., 2004. The genotoxicity of ambient outdoor air,  
1224 a review: *Salmonella* mutagenicity. Mutat. Res. 567, 347-399.

- 1225 Cordeiro, J.L.P., Hasenack, H. 2009. Cobertura vegetal atual do Rio Grande do Sull. In:  
1226 Pillar, V. D.; Müller, S. C.; Castilhos, Z. M. S.; Jacques, A. V. A. (ed.) Campos Sulinos  
1227 conservação e uso sustentável da biodiversidade. Ministério do Meio Ambiente. Brasília,  
1228 403 p. il. col. Capítulo 23. p. 285 – 299 (in Portuguese).
- 1229 Coronas, M.V., Bavaresco, J., Rocha, J.A.V., Gelle, A.M., Caramão, E.B., Rodrigues,  
1230 M.L.K., Vargas, V.M.F. 2013. Attic dust assessment near a wood treatment plant: Past air  
1231 pollution and potential exposure. *Ecotox. and Environ.* 95, 153–160.
- 1232 Costa, T.C., Brito, K.C.T., Rocha, J.A.V., Leal, K. A., Rodrigues, M.L.K., Minella, J.P.G.,  
1233 Matsumoto, S.T., Vargas, V.M.F. 2012. Run off of genotoxic compounds in river basin  
1234 sediment under the influence of contaminated soils. *Ecotox. Environ.* 75, 63–72.
- 1235 Costa, T.C., Brito, K.C.T., Rocha, J.A.V., Leal, K. A., Rodrigues, M.L.K., Minella, J.P.G.,  
1236 Matsumoto, S.T., Vargas, V.M.F. 2017. Corrigendum to: Runoff of genotoxic  
1237 compounds in river basin sediment under the influence of contaminated soils [*Ecotoxicol.*  
1238 *Environ. Saf.* 75 (2012) 63–72]. *Ecotox. Environ.* 143, 351–352.
- 1239 Fenech, M. 1993. The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the  
1240 method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutation*  
1241 *Research*, Amsterdam. 285, 35-44.
- 1242 Fenech, M., Crott, J., Turner, J., Brown, S. 1999. Necrosis, apoptosis, cytostasis and DNA  
1243 damage in human lymphocytes measured assay: description of the  
1244 method and results for hydrogen peroxide. *Mutagenesis.* 14(6), 605–612.
- 1245 FEPAM - Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luis Roessler, 2010.  
1246 Estratégias ecotoxicológicas para caracterizar áreas contaminadas como medida de  
1247 risco à saúde populacional [Ecotoxicological strategies to characterize contaminated  
1248 areas as a measure of population health risk]. Vargas VMF (coord.). Eco-Risco Saúde  
1249 Project Report, Porto Alegre, p. 164 (in portuguese).
- 1250 Fernandes, T.C.C., Mazzeo, D.E.C., Marin-Morales, M.A. 2007. Mechanism of micronuclei  
1251 formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide.  
1252 *Pesticide Biochemistry and Physiology.* 88, 252–259.
- 1253 Gameiro a, P.H., Pereira, N.C., Rocha, J.A.V., Leal, K.A., Varga, V.M.F. 2018a. Assessment  
1254 of Sediment Mutagenicity in Areas under the Influence of a Contaminated Site  
1255 Undergoing a Remediation Process. *Environ. Mol. Mutagen.* 59, 625-638.
- 1256 Gameiro b, P.H., Pereira, N.C., Rocha, J.A.V., Leal, K.A., Vargas, V.M.F. 2018b. PAHs as  
1257 quality markers of the sediments in the Lower Taquari sub-basin during the period of  
1258 intervention in a contaminated site. *Ecotoxicol. Environ. Contam.* 13(2), 19-23.
- 1259 Goufopoulos, S.K., Nikolasou, A.D., Kostopoulou, M.N., Xilourgidis, N.K., Vagi, M.C.,  
1260 Lekkas, D.T., 2003. Organochlorine pesticides in the surface waters of northern Greece.  
1261 *Chemosphere* 50, 507–516.
- 1262 Gnecco, I., Berretta, C., Lanza L.G., La Barbera P. 2005. Storm water pollution in the urban  
1263 environment of Genoa, Italy. *Atmospheric Research.* 77, 60–73.
- 1264 Grabow, W., Denkhaus, R., Van Rossum, P.G. 1980. Detection of mutagens in waste water, a  
1265 polluted river and drinking water by means of the Ames Salmonella typhimurium and  
1266 microsome assay. *S. Afr. J. Sci.* 76, 118–123.
- 1267 Grant, W.F. 1994. The present status of higher plant bioassays for detection of environmental  
1268 mutagens. *Mutation Research*, 310, 175–185.
- 1269 Guillén, D., Ginebreda, A., Farré, M., Darbra, R.M., Petrovic, M., Gros, M., Barceló, D.  
1270 2012. Prioritization of chemicals in the aquatic environment based on risk assessment:  
1271 analytical, modeling and regulatory perspective. *Sci. Total Environ.* 440, 236-252.
- 1272 Gulley, D., 1996, Toxstat 3.5, West Inc. University of Wyoming. Cheyenne, Wyoming.

- 1273 Hagiwara, Y., Watanabe, M., Oda, Y., Sofuni, T., Nohmi, T. 1993. Specificity and sensitivity  
1274 of *Salmonella typhimurium* YG1041 and YG1042 strains possessing elevated levels of  
1275 both nitroreductase and acetyltransferase activity. *Mutat. Res.* 291,171–180.
- 1276 Hakura, A., Shimada, H., Nakajima, M., Sui, H., Kitamoto, S., Suzuki, S., Satoh, T. 2005.  
1277 *Salmonella*/human S9 mutagenicity test: a collaborative study with 58 compounds.  
1278 *Mutagenesis*, 20 (3), 217–228.
- 1279 Hasenack, H. & Cordeiro, J.L.P. 2006. Mapeamento da cobertura vegetal do Bioma Pampa.  
1280 Porto Alegre, UFRGS Centro de Ecologia. 30 p. (Relatório técnico Ministério do Meio  
1281 Ambiente: Secretaria de Biodiversidade e Florestas no âmbito do mapeamento da  
1282 cobertura vegetal dos biomas brasileiros) (in Portuguese).
- 1283 Hasenack, H., Weber, E.(org.). 2010. Base cartográfica vetorial contínua do Rio Grande do  
1284 Sul - escala 1:50.000. Porto Alegre: UFRGS Centro de Ecologia (in Portuguese).
- 1285 Henn K., Braunbeck, T. 2011. Dechoriation as a tool to improve the fish embryo toxicity  
1286 test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*). *Comp Biochem Physiol C Toxicol*  
1287 *Pharmacol.* 153(1):91-8.
- 1288 Holt, M. S. 2000. Sources of chemical contaminants and routes into the freshwater  
1289 environment. *Food Chem. Toxicol.* 38, 521-527.
- 1290 Houk, V. 1992. The genotoxicity of industrial wastes and effluents: A review. *Mutat.* 277, 91-  
1291 138.
- 1292 Hug, C., Sievers, M., Ottermanns, R., Hollert, H., Brack, W., Krauss, M. 2015. Linking  
1293 mutagenic activity to micropollutant concentrations in wastewater samples by partial  
1294 least square regression and subsequent identification of variables. *Chemosphere*.138,  
1295 176–182.
- 1296 IARC (Internacional Agency for Reserch on Câncer). 2010. Monographs on the evaluation of  
1297 carcinogenic risks to humans, 2010. Some non-heterocyclic aromatic hidrocarbons and  
1298 some related exposure. IARC, Lyon, 92, p.33-110.
- 1299 Kado, N., Guirguis, G., Flessel, C., Chan, R., Chang, K., Wesolowski, J. 1986. Mutagenicity of  
1300 fine (less than 2.5 microns) airborne particles: diurnal variation in community air  
1301 determined by a *Salmonella* micro preincubation (microsuspension) procedure. *Environ.*  
1302 *Mutagen.* 8, 53-66.
- 1303 Karabay, N.U., Gunnehir, O.M., 2005. Cytogenetic and genotóxico effects of the insecticides,  
1304 imidacloprid and methamidophos. *Genet. Mol. Res.* 4, 653–662.
- 1305 Kim, R.H., Lee, S., Kim, Y. M., Lee, J.H., Kim, S.K., Kim, S.G. 2005. Pollutants in rainwater  
1306 runoff in Korea: their impacts on rainwater utilization. *Environmental Technology.* 26,  
1307 411– 420.
- 1308 Lammer, E., Carr, G., Wendler, K., Rawlings, J., Belanger, S., Braunbeck, T. 2009. Is the fish  
1309 embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the  
1310 fish acute toxicity test? *Comp. Biochem. Physiol., Part C* 149 (2), 196–209.
- 1311 Leme, D.M., Marin-Morales, M.A. 2009. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A  
1312 review on its application. *Mutat Res.* 682, 71–81.
- 1313 Lemos, C.T., Roedel, P.M., Terra, N.R., Oliveira, N.C.D., Erdtmann, B. 2007. River water  
1314 genotoxicity evaluation using micronucleus assay in fish erythrocytes. *Ecotox. Environ.*  
1315 *Safe* 66, 391–401.
- 1316 Levin, D.E., Yamasaki, E., Ames, B.N. 1982. A new *Salmonella* tester strain, TA97, for the  
1317 detection of frameshift mutagens. A run of cytosines as a mutational hot-spot. *Mutat.*  
1318 *Res.* 2, 315-30.
- 1319 Li, J.F., Li, W.H., Jin, T.Y., Ding, X.C. 2005. Zebrafish and its application in environmental  
1320 toxicology. *Journal of Environmental and Occupational Medicine.* 22(5), 460–463.

- 1321 Li, L.Q., Yin, C.Q., He, Q.C., Kong, L.L. 2007. Contribution of pollution load of storm runoff  
1322 in urban areas of Hanyang, Wuhan City on the receiving water. *China Environmental*  
1323 *Science*. 27, 312–316.
- 1324 Lima, E.A.R., Siqueira, G.W., Lima, W.N. 2006. Utilização de critérios de avaliação ambiental  
1325 de metais pesados nos sedimentos de fundo da plataforma continental do Amazonas. *Bol.*  
1326 *Mus. Para. Emílio Goeldi. Ciências Naturais*, Belém. 1, 105-114 (in Portuguese).
- 1327 Loper, J.C. 1984. Biological testing of waterborne organics, in: I.H. Suffet, M. Malaiyandi  
1328 (Eds.), *Organic Pollutants in Water: Sampling, Analysis and Toxicity Testing*. *Advances*  
1329 *in Chemistry*, Series 214, American Chemical Society. 595–604.
- 1330 Luo, Y., Guo, W., Ngo, H. H., Nghiem, L.D., Hai, F. Ibney., Zhang, J., Liang, S. 2014. A  
1331 review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and  
1332 removal during wastewater treatment. *Science of the Total Environment*, 473-474  
1333 (March), 619-641.
- 1334 Ma, T.H.; Xu, Z.; Xu, C.; McConnell, H.; Rabago, E.V.; Arreola, G.A. & Zhang, H. 1995. The  
1335 improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental  
1336 pollutants. *Mutation Research*. 334, 185-195.
- 1337 Maron, D.M., Ames, B.N. 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test.  
1338 *Mutat. Res.* 11,173-215.
- 1339 Matsumoto, S.T., Mantovani, M.S., Malagutti, M.I.A., Dias, A.L., Fonseca, I.C., Marin-Morales,  
1340 M.A. 2006. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents,  
1341 as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis*  
1342 *niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. *Genet. Mol.* 29, 148–158.
- 1343 Monica, L., Wolfgang, G., Jurgen, M., Roland, G. 1995. Comparison of testing acute toxicity  
1344 on embryo of zebrafish, *Brachydaniorerio* and RTG-2 cytotoxicity as possible  
1345 alternatives to the acute fish test. *Chemosphere*. 30 (11), 2087–2102.
- 1346 Mortelmans, K., Zeiger, E. 2000. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay.  
1347 *Mutat. Res.* 455, 29–60.
- 1348 Nagel, R. 2002. DarT: The embryo test with the zebrafish *Danio rerio*"a general model in  
1349 ecotoxicology and toxicology. *Altex* 19 (Suppl 1), 38–48.
- 1350 Nunes, E. A., Lemos, C.T., Gavronski, L., Moreira, T. N., Oliveira, N.C.D., Silva, J. 2011.  
1351 Genotoxic assessment on river water using different biological systems. *Chemosphere*.  
1352 84, 47–53.
- 1353 OECD (Organization for Economic Co-Operation and Development). 2013. Guideline for  
1354 Testing of Chemicals. Fish Embryo Toxicity (FET) Test (236).
- 1355 Ohe, T., Watanabe, T., Wakabayashi, K. 2004. Mutagens in surface waters: a review.  
1356 *Mutation Research*. 567, 109-149.
- 1357 Pagano, A. D., Zeiger, E. 1992. Conditions for detecting the mutagenicity of divalent metals  
1358 in *Salmonella typhimurium*. *Environ. Mol. Mutag.* 19, 139-146.
- 1359 Pereira, T.S., Rocha, J.A.V., Duccatti, A., Silveria, G.A., Pastoriza, T.F., Bringuenti, L.,  
1360 Vargas, V.M.F. 2007. Evaluation of mutagenic activity in supply water at three sites in  
1361 the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Mutat. Res.* 629, 71-80.
- 1362 Pohren, R.S., Rocha, J.A.V., Leal, K.A., Vargas, V.M.F. 2012. Soil mutagenicity as a strategy  
1363 to evaluate environmental and health risks in a contaminated area. *Environ.* 44, 40–52.
- 1364 Pohren, R.S., Rocha, Costa, T.C., Vargas, V.M.F. 2013. Investigation of Sensitivity of the  
1365 *Allium cepa* Test as an Alert System to Evaluate the Genotoxic Potential of Soil  
1366 Contaminated by Heavy Metals. *Water Air Soil Pollut.* 224, 1460-1470.
- 1367 Rigaud, S., Giorgio, C.D., Radakovitch, O., Garnier, J., Méo M.D. 2012. Genotoxicity of  
1368 sediment extracts of the Berre lagoon (France). *Chemosphere*. 88, 937-944.



1369 RS, (Rio Grande do Sul). Secretaria Estadual do Meio Ambiente / Departamento de Recursos  
1370 Hídricos (SEMA/DRH)/Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luiz  
1371 Roessler – FEPAM/Comitê de Gerenciamento da Bacia Hidrográfica do Rio Taquari-  
1372 Antas. Plano de Bacia Hidrográfica do Rio Taquari – Antas. Relatório Síntese - Etapa A  
1373 e B . Elaborado por: STE – Serviços Técnicos de Engenharia. 2012 (in Portuguese).

1374 Song, Y., Li, G., Thornton, S.F., Thompson, I.P., Banwart, S.A., Lerner, D.N., Huang, W.E.  
1375 2009. Optimization of bacterial whole cell bioreporters for toxicity assay of  
1376 environmental samples. *Environ. Sci. Technol.* 43, 7931–7938.

1377 Stahl, R.G. 1991. The genetic toxicology of organic compounds in natural waters and  
1378 wastewaters. *Ecotoxicol Environ Saf.* 22, 94–125.

1379 Tagliari, K.C., Cecchini, R., Rocha, J.A.V., Vargas, V.M.F. 2004. Mutagenicity of sediment  
1380 and biomarkers of oxidative stress in fish from aquatic environments under the influence  
1381 of tanneries. *Mutat. Res.* 561, 101–117.

1382 Thomas, R.L. 1987. A protocol for these lection of process-oriented remedial options to  
1383 control in situ sediments contaminants. Ecological effects of in situ sediments  
1384 contaminants. *Hydrobiology.* 149, 247-258.

1385 Tijani, J.O., Fatoba, O.O., Babajide, O.O., Petrik, L.F. 2016. Pharmaceuticals, endocrine  
1386 disruptors, personal care products, nanomaterials and perfluorinated pollutants: a review.  
1387 *Environ Chem Lett.* 14, 27–49.

1388 Umbuzeiro, G.d.A., Roubicek, D.A., Sanchez, P.S., Sato, M.I. 2001. The Salmonella  
1389 mutagenicity assay in a surface water quality monitoring program based on a 20-year  
1390 survey. *Mutat. Res.* 491,119–126.

1391 USEPA. 1992. Method 196A: Chromium, Hexavalent (Colorimetric); SW-846. Third Edition,  
1392 Update V. U.S. Government Printing Office, Washington DC.

1393 USEPA. 1996. Method 3050B: Acid digestion of sediments, sludges, and soils; test Methods  
1394 For Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods; SW-846. Revision 2.  
1395 Government Printing Office, Washington DC.

1396 USEPA. 2007a. Method 6010C: Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy;  
1397 Test Methods For Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods. SW-846;  
1398 Revision 3. Government Printing Office, Washington DC.

1399 USEPA. 2007b. Method 7471B: Mercury in Solid or Semisolid Waste (Manual Cold-Vapor  
1400 Technique). Revision I. Government Printing Office, Washington DC.

1401 USEPA. 2007c. Method 3550C: Ultrasonic Extraction. Available.  
1402 <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/3550c.pdf>.

1403 Valent, G.U., Sato, M.I., Coelho, M.C., Coimbra, C. A., Sanchez, P.S. 1993. Monitoring  
1404 São Paulo state rivers in Brazil for mutagenic activity using the Ames test. *Environ*  
1405 *ToxicolWater Qual.* 8, 371–381.

1406 Vargas, V.M.F., Motta, V.E.P., Henriques, J.A.P. 1993. Mutagenic activity detected by the  
1407 Ames test in river water under the influence of petrochemical industries. *Mutat. Res.* 319,  
1408 31-45.

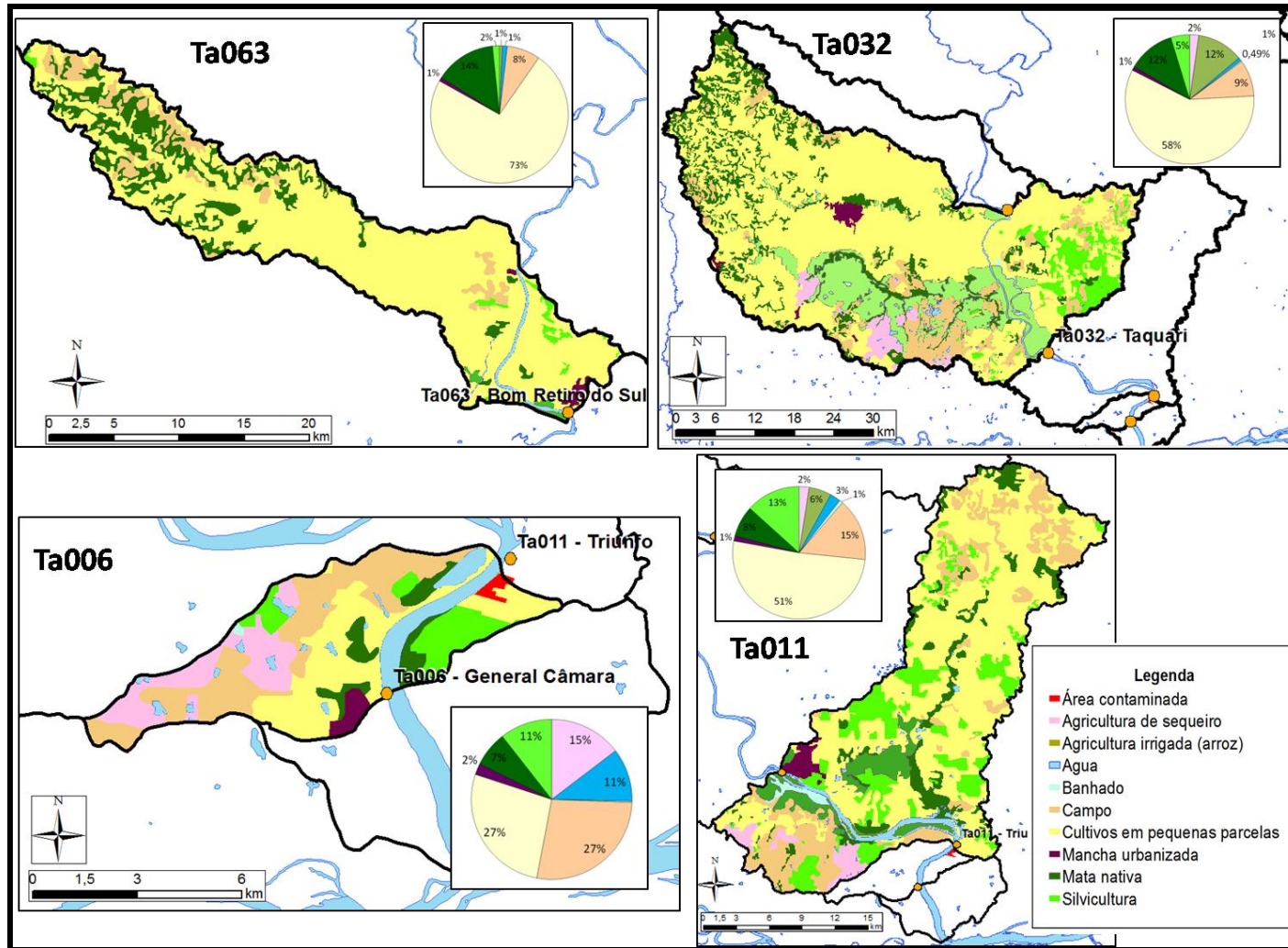
1409 Vargas, V.M.F., Guidobono, R.R., Jordão, C., Henriques, J.A.P. 1995. Use of two short term  
1410 test to evaluate genotoxicity of river water treated with different concentration extraction  
1411 procedure. *Mutat Res.* 343, 31–52.

1412 Vargas, V.M.F., Migliavacca, S.B., Melo, A.C., Horn, R.C., Guidobono, R.R.; Ferreira,  
1413 I.C.F.S.; Pestana, M.H.D. 2001. Genotoxicity assessment in aquatic environments under  
1414 the influence of heavy metals and organic contaminants. *Mutat. Res.* 490, 141–158.

1415 Weber, E.J., Hoffmann, G.S., Oliveira, C.V., Hasenack, H. (Org.). 2016. Uso e cobertura  
1416 vegetal do Estado do Rio Grande do Sul – situação em 2009. Porto Alegre. UFRGS IB  
1417 Centro de Ecologia (In Portuguese).

- 1418 White, P.A., Claxton, L.D. 2004. Mutagens in contaminated soil: a review. *Mutat Res.* 567,  
1419 227-345.
- 1420 White, P.A., Rasmussen, J.B., Blaise, C. 1998. Genotoxic substances in the St. Lawrence  
1421 system I: Industrial genotoxins sorbed to particulate matter in the St. Lawrence, St.  
1422 Maurice, and Saguenay Rivers, Canada, *Environ. Toxicol. Chem.* 17: 286–303.
- 1423 Xing, W.P., Zhao, H.K., Jiang, Z.R. 2002. A application of micronucleus assay in genetic  
1424 toxicology. *Anhui Journal of Preventive Medicine.*8, (5), 317–320 (in Chinese).
- 1425 Zanutelli, M.L., Stülp, S., Ethur, E.M., Passos, I.S., Marmitt, S., Caramão, E.B. 2004. Análise  
1426 de pesticidas organofosforados em sedimentos dos recursos hídricos do vale do Taquari.  
1427 In: IV Simpósio Internacional de Qualidade Ambiental. Porto Alegre. Tema 6, trabalho  
1428 332 (In Portuguese).
- 1429 Zar, J.H. 1996. *Biostatistical Analysis*. 3rd ed., Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ.
- 1430 Zhao, J.W., Shan, B.Q., Yin, C.Q. 2006. Effect of impervious surface on stormwater runoff  
1431 pollution in urban tourist attractions. *Techniques and Equipment for Environmental.*  
1432 *Pollution Control.* 7(12), 14–17.
- 1433
- 1434
- 1435
- 1436

7. Appendices



1439 Figure A.1. Land use and cover in the areas delimited at the sampling sites in front of the public water supply abstraction pump.

1440 **Table A.1.** Surface occupied by different types of land use and cover in the Taquari-Anta river basin. Total area delimited and delimited areas  
 1441 of the four sites of water supply abstraction.

Land use/Land cover type <sup>a</sup>	Taquari–Antas Basin <sup>a</sup>		Total DLA		DLA063 <sup>b</sup>		DLA032		DLA011		DLA006	
	Area (ha)	(%)	Area (ha)	(%)	Area (ha)	(%)	Area (ha)	(%)	Area (ha)	(%)	Area (ha)	(%)
Water	13,771.12	0.52	3,897.15	1.33	402.46	1.13	1,602.86	0.82	1,486.34	2.59	405.49	10.75
Wetland	994.75	0.04	994.58	0.34	0	0	521.76	0.27	463.43	0.81	9.39	0.25
Native forest	430,760.64	16.35	32,863.08	11.23	5,123.46	14.36	23,126.29	11.82	4,344.44	7.57	268.89	7.13
Grassland	730,565.63	27.73	30,516.09	10.43	2,793.94	7.83	17,939.79	9.17	8,749.96	15.25	1,032.40	27.36
Crops in small plots <sup>c</sup>	996,482.98	37.83	170,828.20	58.39	26,208.63	73.48	114,170.50	58.33	29,426.87	51.27	1,022.20	27.09
Dry agriculture <sup>c</sup>	335,715.23	12.74	6,431.55	2.20	0	0	4,468.87	2.28	1,411.51	2.46	551.17	14.61
Irrigated agriculture (rice) <sup>c</sup>	29,589.43	1.12	26,126.20	8.93	242.02	0.68	22,727.92	11.61	3,156.26	5.50	0	0
Silviculture <sup>c</sup>	67,898.20	2.58	17,869.18	6.11	580.95	1.63	9,258.81	4.73	7,631.65	13.30	397.77	10.54
Urban area	28,676.03	1.09	3,029.63	1.04	315.92	0.89	1,905.02	0.97	723.09	1.26	85.60	2.27
<b>Total</b>	<b>2,634,454.00</b>	<b>100</b>	<b>292,555.70</b>	<b>100</b>	<b>35,667.38</b>	<b>100</b>	<b>195,721.83</b>	<b>100</b>	<b>57,393.56</b>	<b>100</b>	<b>3,772.93</b>	<b>100</b>

1442 <sup>a</sup> Cordeiro & Hasenack (2009)

1443 <sup>b</sup> DLA (Delimitation Area) followed by the number of kilometers away from the mouth

1444 <sup>c</sup> agricultural areas

1445

1446

1447

1448 **Table A.2.** Impactful uses and activities in the study regions

Abstraction Water	Uses
Ta063 <sup>a</sup>	Tourism, leisure, fishing, waterway transportation, in addition to medium (MPP) and high polluting potential (HPP) agricultural and industrial activities.
Ta032	Tourism and leisure, fishing, waterway transport, sand, gravel and clay extraction, irrigated agriculture, silviculture of exotic species and MPP and HPP industries;
Ta011	Irrigated agriculture and silviculture of exotic species.
Ta006	Fishing, transportation, recreation, sand, gravel and clay extraction, irrigated agriculture and forestry of exotic species.

1449  
 1450 a: The sites were named using the initial letters of the river (Ta) followed by the number of  
 1451 kilometers away from the mouth.

1452

1453 **Capítulo 2 - Presença de compostos mutagênicos na água potável de quatro**  
1454 **idades do sul do Brasil**

1455 Paula Hauber Gameiro <sup>a</sup>, Kauê Hohn Assis <sup>b</sup>, Lívia Rozino <sup>b</sup>, Ismael Krüger Pescke <sup>b</sup>, Tatiane  
1456 Rocha Cardozo <sup>c</sup>, Flávio Andre Pavan<sup>c</sup>, Vera Maria Ferrão Vargas<sup>ab\*</sup>

1457

1458 <sup>a</sup>Programa de Pós-graduação em Ecologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
1459 (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9500, 91501-970, Cx Postal 15007, Porto Alegre, RS, Brazil

1460 <sup>b</sup>Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luís Roessler (Programa de Iniciação  
1461 Científica/FEPAM), Rua Aurélio Porto, 37, 90620-090, Porto Alegre, RS, Brazil.

1462 <sup>c</sup>Departamento de Química, Campus Bagé, Universidade Federal do Pampa. Av. Maria  
1463 Anunciação Gomes de Godoy, 1650 - Bairro Malafaia - Bagé, RS, Brazil.

1464

1465 \*Programa de Pós-graduação em Ecologia  
1466 Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)  
1467 Av. Bento Gonçalves, 9500, Cx Postal 15007, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil  
1468 E-mail: verafvargas@gmail.com.

1469

1470

1471

1472

1473

1474

1475

1476

1477

1478

1479

1480

1481

1482

1483

1484

1485

1486

1487

1488 **Resumo**

1489

1490 Subprodutos de desinfecção (DBPs) genotóxicos são formados durante o tratamento  
1491 convencional quando o desinfectante reage com a matéria orgânica presente na água  
1492 superficial. Recentemente alguns compostos têm sido encontrados em concentrações muito  
1493 baixas no ambiente e podem ser carregados para a água tratada, os conhecidos micropoluentes  
1494 emergentes (MEs). Este estudo investigou a presença de compostos mutagênicos em água,  
1495 antes e após tratamento, de quatro cidades que captam água do Rio Taquari, sul do Brasil. As  
1496 estações de tratamento de água (ETAs) estudadas foram: (WTP01), (WTP02), (WTP03) e  
1497 (WTP04). As amostragens foram realizadas nas estações de tratamento para análises químicas  
1498 de MEs e de mutagênese no ensaio *Salmonella*/microsoma. As linhagens utilizadas foram  
1499 TA98, que mede erro no quadro de leitura e TA100 e YG7108, substituição de pares de bases  
1500 do DNA, na ausência e presença de metabolização (S9 humana). A mutagênese na água bruta  
1501 foi encontrada apenas na WTP03, pela linhagem Ta98 com e sem S9, reduzindo 90% após  
1502 tratamento. Nas amostras de água tratada, resultados significativos foram encontrados para as  
1503 duas linhagens, sendo a mais sensível a TA100. A ordem decrescente de respostas positivas  
1504 foi: WTP04>WTP02>WTP01>WTP03. No estudo foram incluídos ainda resultados de  
1505 amostragem realizada anteriormente no local WTP04, indicando que a mutagênese na água  
1506 tratada já estava presente, porém com outro padrão de resposta. As análises químicas  
1507 indicaram que o local WTP04 foi o que apresentou teores de MEs totais mais elevados, sendo  
1508 a atrazina, paracetamol e ácido salicílico, os predominantes. Nos demais locais também foram  
1509 encontrados MEs, sendo o WTP02 com menor valor total na água tratada, representando uma  
1510 redução de 45,3% de MEs comparados com a bruta. A presença de MEs nas amostras de água  
1511 após o tratamento sugeriu a importância de diretrizes que incluam os MEs para estabelecerem  
1512 melhores padrões de preservação da vida aquática, conservação dos mananciais e potabilidade  
1513 da água distribuída à população.

1514 **Palavras chaves:** Ensaio *Salmonella*/microsoma; S9 humano *in vitro*; micropoluentes  
1515 emergentes; extratos orgânicos; DPBs micropoluentes.

1516

1517

1518

1519

## 1520 1. Introdução

1521 A redução de várias doenças com a descoberta da desinfecção da água potável foi um  
1522 marco importante para saúde pública, porém existe outra preocupação relacionada a formação  
1523 de subprodutos de desinfecção (DPBs), especialmente devido à extensa exposição da  
1524 população humana a estes compostos (Cortés & Marcos, 2018). Os DBPs são formados  
1525 durante o tratamento da água através da reação dos desinfetantes (cloro, cloraminas ou  
1526 dióxido de cloro) com matéria orgânica natural (MON) e/ou brometo/iodeto presentes na  
1527 maioria dos rios, lagos e águas subterrâneas (Richardson et al., 2007). Nos últimos 40 anos,  
1528 estudos epidemiológicos verificaram uma correlação entre o consumo da água tratada e  
1529 câncer no trato gastrointestinal, urinário, além de outros efeitos como complicações no  
1530 desenvolvimento e reprodução podem ser observados (Legay et al., 2010; Grellier et al.,  
1531 2015).

1532 Os DPBs são amplamente estudados e, embora mais de 600 DBPs já tenham sido  
1533 relatados na literatura (Richardson, 1998; Boorman et al., 1999), apenas um pequeno número  
1534 tem sido avaliado em estudos de ocorrência quantitativa ou de efeitos na saúde. A USEPA  
1535 (Agência de Proteção Ambiental dos EUA) determina os níveis máximos de 11 DBPs na água  
1536 potável, enquanto as diretrizes da Organização Mundial da Saúde incluem 14 DBPs  
1537 (Richardson et al., 2007). O cloro é o desinfetante mais utilizado e a relação entre sua dose e a  
1538 concentração de matéria orgânica é um fator determinante na formação de subprodutos  
1539 (Pereira et al., 2007). A presença de moléculas aromáticas parece aumentar a formação de  
1540 DBPs (Nihemaiti et al., 2017). Tradicionalmente, o foco dos poluentes químicos são os  
1541 hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), bifenilas policloradas (PCBs) e os pesticidas  
1542 organoclorados. Entretanto, o uso desenfreado de agrotóxicos e o crescente desenvolvimento  
1543 de novos medicamentos e nanomateriais geraram um desafio adicional para definir métodos



1544 de detecção para esses compostos, considerados micropoluentes emergentes (ME), um novo e  
1545 grave problema ambiental (Satinder, 2009). Os efluentes sanitários e hospitalares são a  
1546 principal fonte de entrada desta classe de espécies químicas no meio ambiente, podendo  
1547 atingir mananciais de águas superficiais ou subterrâneas (Luo et al, 2014). Estes produtos  
1548 apresentam efeitos mesmo em baixas concentrações, sendo também relacionadas a processo  
1549 de bioacumulação e fenômeno de biomagnificação, persistência, toxicidades, potencialidade  
1550 de desregulação endócrina, além de efeitos carcinogênicos, mutagênicos e  
1551 teratogênicos (Guillén et al., 2012).

1552         A natureza hidrofóbica de alguns contaminantes favorece a ocorrência de reações de  
1553 adsorção destes compostos no material particulado em suspensão. No tratamento  
1554 convencional de água são utilizados processos físico-químicos para a potabilização, dentre os  
1555 quais as unidades de clarificação (floculadores, decantadores e filtros), de desinfecção  
1556 (cloradores e aminoadores) e de polimento (correção do pH e fluoretação). Assim como nas  
1557 estações de tratamento de esgoto (ETE), os processos convencionais de tratamento nas  
1558 estações de tratamento de água (ETA) não são eficientes para a eliminação de inúmeros  
1559 desses contaminantes, devido principalmente a natureza polar de muitos deles (Wang et. al.,  
1560 2011; Stackelberg et. al., 2007; Bodzek & Dudziak, 2006). Consequentemente, alguns deles  
1561 acabam sendo encontrados na água tratada distribuída à população a qual é oriunda de  
1562 mananciais já comprometidos (Raimundo, 2011; Ternes et al., 2015). O destino e os efeitos  
1563 de micropoluentes emergentes em águas brasileiras ainda têm sido pouco discutidos na  
1564 literatura. Entretanto, a principal via de aporte deles em águas superficiais é o esgoto bruto,  
1565 uma vez que a maioria dos brasileiros não possui rede coletora de esgoto, descartando os  
1566 dejetos diretamente nos rios e nos solos (Raimundo, 2011; IBGE, 2019).

1567 Os primeiros DBPs de cloração a serem descobertos foram da classe dos  
1568 trihalometanos (THMs) (Meier et al., 1983). A formação dos THMs recebe atenção especial  
1569 devido a sua classificação como Grupo 2B, possível carcinogênico ao homem (IARC, 1999a;  
1570 1999b). Outras classes de DBPs também são formadas com o uso do cloro: ácidos  
1571 haloacéticos (HAAs), halonitrometanos (HNMs), haloacetoneitrilos, cloraminas, clorofenóis,  
1572 os chamados "Mutagênico X" (3-cloro-4- (diclorometil) - 5-hidroxi-2 (5H) -furanona - MX) e  
1573 as N-nitrosaminas (N-nitrosodimetilamina - NDMA). Apesar do grande número de DBPs  
1574 formados durante a desinfecção, estudos avaliando a mutagenicidade de DBPs individuais se  
1575 concentraram principalmente nas N-nitrosaminas e nas halofuranonas ou na MX (Cortés &  
1576 Marcos, 2018). Essa halofuranona é altamente mutagênica, testada sozinha ou em combinação  
1577 com outros contaminantes da água desinfetada (Wang et al., 2013). As NDMA são  
1578 reconhecidas como DBP mais tóxico (Nawrocki & Andrzejewski, 2011), com sete deles  
1579 sendo classificados USEPA como B2, ou seja, prováveis agentes cancerígenos (USEPA,  
1580 2012).

1581 Dentre os MEs detectados na água destacam-se: os fármacos (paracetamol, ácido  
1582 acetilsalicílico, diclofenaco, tetraciclina, amoxicilina, cafeína), os pesticidas (atrazina,  
1583 diuron, 2-nitrofenol e 4-nitrofenol) e outros fenóis. Estudos realizados com o composto ativo  
1584 do paracetamol (acetaminofeno) mostraram que sua reação com o cloro tem formado  
1585 numerosos subprodutos, sendo dois deles considerados compostos tóxicos (Glassmeyer &  
1586 Shoemaker, 2005; Bedner & MacCrehan, 2006a). Ainda verificou-se que a cloração do  
1587 diclofenaco forma pelo menos cinco subprodutos (Bedner & MacCrehan, 2006b). A atrazina é  
1588 um dos herbicidas mais consumidos no Brasil (IBAMA, 2010). Sua principal via de  
1589 exposição ao homem é a ingestão de água tratada, uma vez que a exposição por alimentos não  
1590 é significativa (ATSDR, 2008) e as estações de tratamento de água não são capazes de

1591 remover este contaminante com eficiência (Benotti et al., 2009; Verliefde et al., 2007;  
1592 Quintana et al., 2001). A cafeína, presente em produtos alimentícios e medicamentos, tem  
1593 sido usada como traçador de contaminação por esgoto doméstico em situações onde há  
1594 vazamentos na rede coletora capazes de atingir outros cursos d'água. É considerado um  
1595 marcador químico sensível e específico que pode ser detectado rapidamente, pois se apresenta  
1596 em altas concentrações no esgoto, é estável e bastante solúvel em água (Raimundo, 2011).

1597 Muitos compostos orgânicos semi-voláteis e não-voláteis de natureza polar e apolar,  
1598 extraídos pelas resinas Amberlite XAD são diagnosticados como mutagênicos no ensaio  
1599 *Salmonella*/microsoma (IARC, 1991). Warren et al. (2015) avaliaram a mutagenicidade da  
1600 água superficial, sedimento e água tratada do rio Penobscot, na Índia e verificaram que as  
1601 amostras variaram de não mutagênicas a potências mutagênicas baixas e moderadas. No  
1602 Japão, pesquisadores utilizaram o ensaio *Salmonella* para monitorar a variação sazonal da  
1603 mutagenicidade da água do rio em Fukui, Japão (Watanabe et al., 2002). No Brasil, o órgão  
1604 regulador do Estado de São Paulo, rotineiramente tem monitorado seus rios com o ensaio  
1605 *Salmonella* por mais de 20 anos (Umbuzeiro et al., 2001). Especificamente no Rio Grande do  
1606 Sul (RS), o ensaio foi utilizado por Lemos et al. (2009) que verificaram a influência dos  
1607 fatores climáticos na mutagênese de manancial impactado por diferentes fontes antrópicas no  
1608 rio dos Sinos. Cardozo et al. (2006) definiram a influência de dejetos urbanos na resposta  
1609 mutagênica de pequenas bacias da região metropolitana de Porto Alegre. Pereira et al. (2007)  
1610 analisaram a atividade mutagênica em água de abastecimento público em três cidades do  
1611 estado; e Vargas et al. (1993; 2008) investigaram a presença de substâncias mutagênicas na  
1612 água bruta do rio Caí, região influenciada por indústrias petroquímicas.

1613 O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial mutagênico da carga orgânica na água  
1614 potável, o efeito de subprodutos genotóxicos e a presença de micropoluentes emergentes antes  
1615 e após o tratamento convencional.

1616

## 1617 **2. Materiais e métodos**

### 1618 **2.1. Área de estudo**

1619 A área estudada abrange quatro cidades banhadas pelo Rio Taquari, pertencente à  
1620 Bacia Hidrográfica Taquari-Antas, RS- Brasil, localizada na porção central do estado. Bom  
1621 Retiro do Sul, Taquari, Triunfo e General Câmara pertencem à região do Vale do Taquari,  
1622 tendo como forte característica a produção de alimentos e grande parte de sua atividade  
1623 produtiva gira em torno do agronegócio, além de indústrias de alto e médio potencial  
1624 poluidor. Sua localização está compreendida entre as coordenadas 28°10'S a 29°57'S e  
1625 49°56'W a 52°38'W. Estudos desenvolvidos nesta região por Costa et al. (2012; 2017) e  
1626 Gameiro, (2015) verificaram respostas mutagênicas no sedimento, em locais com influencia  
1627 do escoamento superficial de solo contaminado por preservantes de madeira (pentaclorofenol,  
1628 creosoto e arseniato de cobre cromado - CCA). Gameiro et al. 2018a ainda detectou  
1629 mutagênese nas diferentes fases do processo de remediação do solo desta área e evidências de  
1630 contaminação por agentes mutagênicos em locais de captação de água potável.

1631

### 1632 **2.2. Coleta das amostras**

1633 As amostras de água foram coletadas no inverno de 2017 na estação de tratamento  
1634 (water treatment plant sites = WTP) das quatro cidades banhadas pelo Rio Taquari (Tabela 1 e  
1635 Figura 1), antes e depois do processo de tratamento convencional, segundo Pereira et al.

1636 (2007). O volume amostrado foi de 40L por amostra, sendo os frascos transportados sob-  
 1637 refrigeração e armazenadas a 4 °C por no máximo 10 dias, tempo necessário para a realização  
 1638 das diferentes fases de extração dos compostos orgânicos. Neste trabalho também foram  
 1639 abordados dados da amostragem realizada no outono de 2015, antes e depois do tratamento,  
 1640 denominadas WTP04R2015 (R = Raw = água bruta) e WTP04T2015 (T = Treated = água  
 1641 tratada).

1642 **Tabela 1.** Informações sobre amostragem de água bruta e tratada de quatro cidades do Vale  
 1643 do Taquari RS, Brasil.

Locais	Cidades	Locais de captação de água	Coordenadas
WTP01 <sup>a</sup>	Bom Retiro do Sul	Ta063 <sup>b</sup>	29°36'33.08"S; 51°56'35.17"W
WTP02	Taquari	Ta032	29°47'53.93"S; 51°52'11.69"W
WTP03	Barreto Distrito/Triunfo	Ta011	29°52'18.57"S; 51°42'33.75"W
WTP04	General Câmara	Ta006	29°54'8.88"S; 51°45'34.57"W

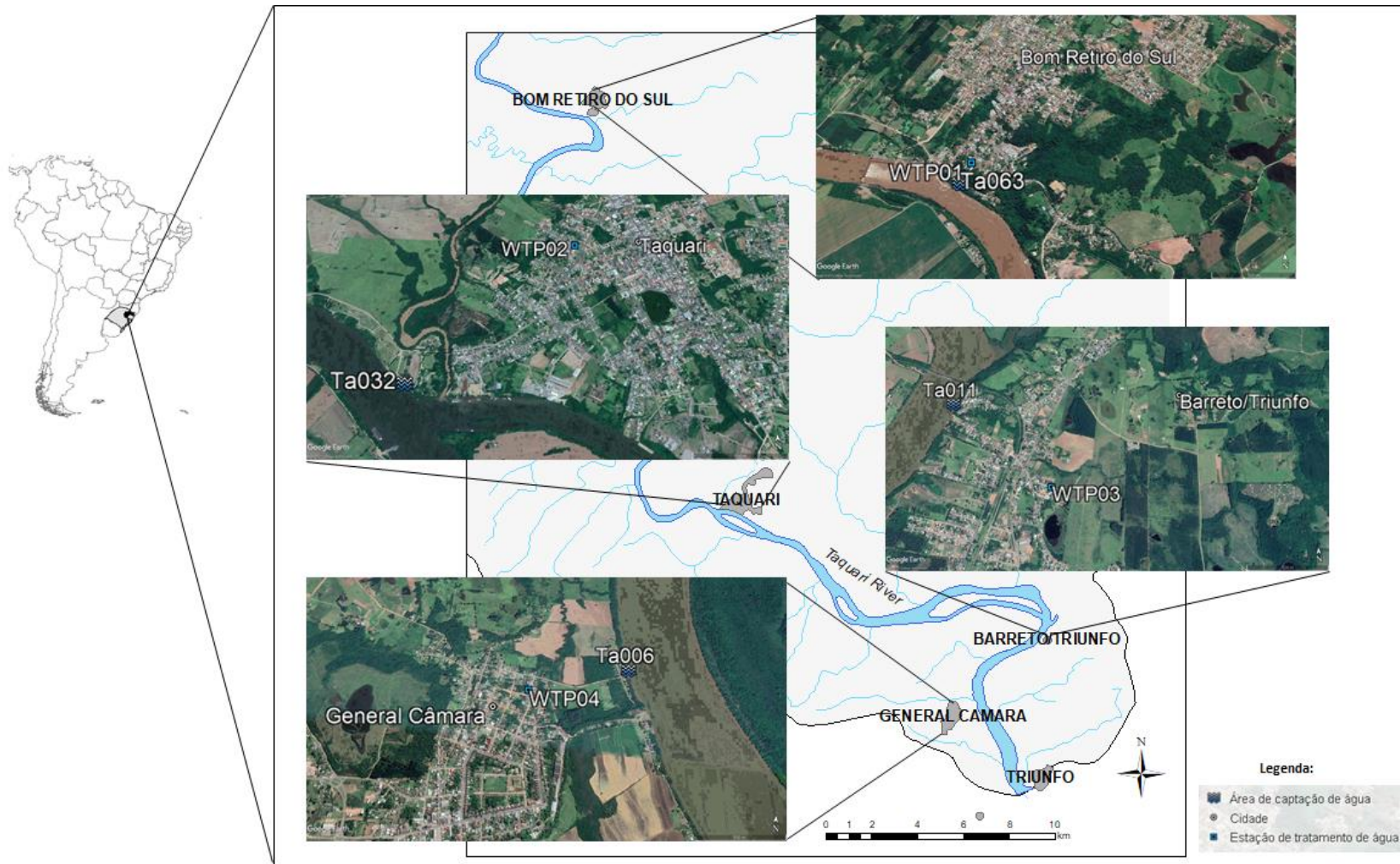
1644 <sup>a</sup> WTP (water treatment plant sites = ETAs - Estação de Tratamento de Águas)

1645 <sup>b</sup>Ta: letras iniciais do rio seguidas pelo número de quilômetros de distância da foz

1646

## 1647 2.1. Extratos orgânicos para testes mutagênicos

1648 A extração dos compostos orgânicos da água (40L) foi realizada com a adsorção em resinas  
 1649 do tipo Amberlite XAD<sub>4</sub> (1 mL/L de amostra), em pH natural e acidificadas pela adição de  
 1650 HCl até pH 2,0 (Pereira et al., 2007). A resina XAD<sub>4</sub> foi pré-lavada usando metanol (CASRN,  
 1651 67-56-1). Em coluna cromatográfica a água passou por sistema fechado a vácuo com fluxo de  
 1652 100 mL/min. Nesta coluna a resina foi tratada com os solventes metanol, éter etílico (CASRN  
 1653 60-29-7), diclorometano (DCM, CASRN, 75-09-2) e água ultrapura (1:1:2:3), conforme o pH  
 1654 da amostra. Após, a eluição dos compostos em pH natural foi realizada em  
 1655 metanol/diclorometano (1:4) para retirada dos compostos moderadamente polares e apolares e  
 1656 a eluição ácida em metanol/etilo acetato (CASRN 141-78-6), para extração dos compostos  
 1657 polares.



1658

1659 **Figura 1.** Localização dos locais de amostragem para a pesquisa de mutagenicidade em água bruta e tratada de quatro cidades do Vale do  
 1660 Taquari. Ta (letras iniciais do Rio Taquari seguido da sua quilometragem de distância em relação a foz); WTP (water treatment plant sites -  
 1661 ETAs).

1662 Após, a eluição dos compostos em pH natural foi realizada em metanol/diclorometano  
1663 (1:4) para retirada dos compostos moderadamente polares e apolares e a eluição ácida em  
1664 metanol/etilo acetato (CASRN 141-78-6), para extração dos compostos polares. Os eluatos  
1665 foram concentrados em rotavapor até um volume de 10 mL e o material orgânico extraído  
1666 (MOE) foi determinado em balança analítica. Por fim, os extratos foram acondicionados em  
1667 frascos graduados à -20°C e no momento do teste os solventes das amostras foram evaporados  
1668 sob fluxo de nitrogênio e em seguida ressuspensos com dimetilsulfóxido grau pesticida  
1669 (DMSO-Riedel-de Haën, CASRN 67-68-5).

## 1670 **2.2. Ensaio *Salmonella*/microsoma**

1671 A atividade mutagênica e citotóxica foi avaliada pelo ensaio *Salmonella*/microsoma  
1672 através do protocolo de microssuspensão desenvolvido por Maron & Ames (1983) e Kado et  
1673 al. (1986). As linhagens utilizadas foram TA98, que detecta mutagênicos por erro no quadro  
1674 de leitura, e TA100 que caracteriza substituição de pares de bases. A linhagem YG7108 foi  
1675 utilizada devido à sua maior sensibilidade a agentes alquilantes (Yamada et al., 1997),  
1676 incluindo as NDMA (Yamada et al., 1997; Wagner et al., 2012). Os ensaios foram realizados  
1677 na presença e ausência de metabolização (S9) - mistura de células de fígado humano (Pooled  
1678 Human liver S9- Moltox, USA).

1679 Os volumes dos extratos utilizados nos ensaios de mutagênese foram 50, 100, 200, 500 e  
1680 750 mL equivalente por L de amostra, em duplicata de ensaios. Em todos os ensaios foram  
1681 utilizados como controles negativos o meio nutriente líquido e o solvente DMSO (5 µL).  
1682 Como controles positivos foram utilizados a azida sódica (AZS – CASRN 26628-22-8, Merck  
1683 do Brasil) e 4-nitroquinoleína-1-óxido (4NQO, CASRN 56-57-5, Sigma Chemical Company)  
1684 em ensaios sem S9 mix e 2-aminofluoreno (2AF CASRN 153-78-6, Sigma Chemical  
1685 Company) com S9 mix. Com base na faixa observada dos dados históricos do laboratório a

1686 mutação espontânea (controles negativos) encontrada para 5 µL DMSO/placa – S9 foi: 41 ±  
1687 8,9 (TA98), 148 ± 48,3 (TA100) revertentes/placa (rev/placa); +S9: 30 ±6,7 (TA98), 149 ±  
1688 45,9 (TA100); Controles positivos, – S9: 4NQO (0,5µg/placa) 382 ± 150,5 (TA98), AZS  
1689 (5µg/placa) 4229 ± 1425 (TA100); +S9: 2AF (10µg/placa) 405 ± 158,4 (TA98), 1334 ± 206,4  
1690 (TA100) e 1022 ± 73,6 (YG7108) rev/placa.

1691 As amostras foram consideradas mutagênicas quando apresentaram ANOVA  
1692 significativa ( $p < 0,05$ ) e dose-resposta positiva ( $p < 0,05$ ). O resultado foi considerado  
1693 indicativo quando apenas um desses critérios foi observado. O número de revertentes por  
1694 placa foi analisado no programa SALANAL (Análise de Salmonella de Ensaio, a versão 1.0  
1695 do Research Triangle Institute, RTP, North Carolina, EUA), selecionando os modelos de  
1696 regressão linear ou Bernstein. Esses valores foram expressos em revertentes por litro (rev/L)  
1697 de amostra de água. A concentração da mutagênese efetiva (CME), que pode dobrar o número  
1698 revertentes espontâneos, foi utilizada para calcular a sensibilidade mutagênica comparando  
1699 diferentes linhagens e condições de ensaios. A citotoxicidade das amostras foi considerada  
1700 positiva quando a porcentagem de células sobreviventes (após 72 horas de incubação) foi  
1701 inferior a 60% comparada ao valor observado no controle negativo (Vargas et al., 1993).

### 1702 **2.3. Análises química: Micropoluentes Emergentes**

1703 Após a coleta das amostras, ajustou-se o pH das mesmas para 3,0 com adição de HCl 6  
1704 mol L<sup>-1</sup> e realizou-se filtração através de membrana de nitrato de celulose de 0,45 µm  
1705 (UNIFIL) em sistema de vácuo para remoção de material particulado em suspensão. As  
1706 amostras filtradas acondicionadas em frascos de vidro âmbar foram mantidas sob refrigeração  
1707 (4°C) para posterior análise. Em etapa subsequente as amostras passaram por um processo de  
1708 extração em fase sólida utilizando cartuchos de extração em fase sólida (SPE) em  
1709 polipropileno Chroma bond® C18 (6 mL/500 mg) e equipamento Manifold à vácuo



1710 (Montagner et al., 2014, com modificações). Para o condicionamento dos cartuchos, foram  
1711 utilizados 5 mL de metanol seguidos de 5 mL de água ultrapurificada. Em seguida, cada  
1712 amostra foi percolada através dos cartuchos com fluxo ajustado para 5 mL.min<sup>-1</sup>. Após  
1713 percolar toda a amostra, os cartuchos foram secos em temperatura ambiente por 24 horas.  
1714 Após a secagem, os analitos foram eluídos com 2 mL de metanol, concentrados em  
1715 equipamento rotaevaporador, transferidos para tubos de ensaio para análise cromatográfica.  
1716 As determinações quantitativas dos poluentes emergentes (diclofenaco sódio, paracetamol,  
1717 ácido acetil salicílico, amoxicilina, tetraciclina, cafeína, atrazina, diuron, 2- nitrofenol, 4-  
1718 nitrofenol, fenol) presentes em águas superficiais foram feitas através da Cromatografia  
1719 Líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando um equipamento da marca equipamento da  
1720 marca Shimadzu® com detector UV-VIS (SPD-20A) e coluna C18 (RESTEK®, 4,6 mm x  
1721 150 mm x 5 µm), fase móvel etanol: água (95 %: 5 %) com fluxo de 1,2 ml min<sup>-1</sup> e volume  
1722 de injeção 20,0 µL. (Montagner et al., 2014, com modificações). As Curvas analíticas foram  
1723 confeccionadas utilizando-se soluções padrões dos analitos nas concentrações de 0,5; 1,0; 2,0;  
1724 3,5; 5,0; 10,0; 15,0, 20,0 e 30 µg L<sup>-1</sup> apresentando os coeficientes de correlação (R<sup>2</sup>) ≥ 0,99.  
1725 Os limites de quantificação do método variaram de 0,018 µg L<sup>-1</sup> a 0,225 µg L<sup>-1</sup>. Todas as  
1726 análises foram feitas em replicatas para melhor confiabilidade dos resultados.

1727

### 1728 **3. Resultados**

#### 1729 **3.1. Potencial mutagênico e citotóxico**

1730 Os resultados do ensaio *Salmonella*/microsoma mostraram que das amostras de água  
1731 bruta, apenas a estação WTP03 apresentou mutagênese e citotoxicidade detectadas pela TA98  
1732 em ensaios diretos do extrato ácido (277±89 rev/L) (Tabela 2). Compostos de ação indireta  
1733 também foram encontrados na fração neutra (184±37,7 rev/L) e ácida (166±29 rev/L) deste

1734 local. Considerando as amostras de água tratada, a resposta mutagênica e/ou indicativa foi  
1735 encontrada em todas as WTPs tanto para mutagênese por erro no quadro de leitura (TA98)  
1736 como por substituição de pares de bases (TA100) (Tabela 2). Entretanto, a linhagem TA100,  
1737 em ensaios com e sem S9, foi a que apresentou valores mais expressivos obtidos nas estações.  
1738 A ordem decrescente de resultados significativos encontrados foi:  
1739 WTP04>WTP02>WTP01>WTP03. Com exceção da WTP01, as outras três estações  
1740 apresentaram valores mais elevados nas frações ácidas em ensaios de ação direta, comparadas  
1741 com as neutras, embora mutagênicos também estivessem presentes nesta última. WTP04  
1742 apresentou potência mutagênica mais elevada, sendo observado um valor de  $1283 \pm 245,8$   
1743 rev/L no extrato ácido. Em relação às respostas significativas para promutágenos, verificou-se  
1744 que WTP04 teve maior valor de rev/L, ( $807 \pm 147,4$  rev/L) em pH ácido, enquanto o local  
1745 WTP02 para pH neutro ( $102 \pm 47,9$  rev/L). A linhagem TA98 detectou valores baixos para  
1746 compostos que causam erro no quadro de leitura, sendo estes encontrados apenas em ensaios  
1747 de ação direta nas estações WTP02, WTP03 e WTP04. É importante destacar que nas  
1748 amostras de Triunfo (WTP03) houve um decréscimo de 90% da mutagenicidade na água  
1749 tratada ( $29 \pm 14$  rev/L) comparada com a detectada na água bruta ( $277 \pm 47$  rev/L). A  
1750 citotoxicidade foi detectada nas amostras de WTP03 e WTP04 (Tabela 2). Os ensaios  
1751 realizados com a linhagem YG7108 não foram significativos.

1752 Na amostragem realizada em 2015 em WTP04, a mutagênese foi encontrada na água  
1753 bruta, em pH ácido, na linhagem TA100 com ativação metabólica ( $362 \pm 41,7$  rev/L), Tabela 2.  
1754 Nos ensaios realizados em água tratada verificou-se também o predomínio de danos por  
1755 substituição de pares de bases, com valores mais elevados em pH neutro, tanto de ação direta  
1756 ( $1263 \pm 188,9$  rev/L) quanto indireta ( $263 \pm 74,2$  rev/L). Valores de menor intensidade foram  
1757 observados em TA98 sem atividade metabólica. Na Figura 2 são mostrados os valores dos

1758 rev/L e a CME avaliados pelo *software* Salanal (Tagliari et al., 2004). Os cálculos de CME  
1759 indicaram que a linhagem TA100 foi a mais sensível na maioria dos ensaios de água tratada,  
1760 destacando a estação WTP04 com as menores dosagens necessárias para dobrar o número de  
1761 colônias revertentes: 0,102 L, na fração neutra, sem S9, amostragem de 2015; 0,103 Lácida,  
1762 com S9, em 2017 e 0,120 L ácida, sem S9, em 2017. Embora a linhagem TA100 tenha sido a  
1763 mais sensível na maioria dos ensaios da água tratada, a TA98 foi a única que detectou a  
1764 presença de compostos mutagênicos na água bruta no local WTP03. Os valores mostraram  
1765 que 0,17 L da amostra ácida - sem S9, 0,211 L da amostra neutra - com S9 e 0,24 L da  
1766 amostra ácida - com S9, foram necessários para dobrar o número de colônias revertentes.

1767 A relação das MOE dos diferentes extratos indicou que a amostra WTP04R de 2015  
1768 em pH neutro, com a maior massa (16,280µg/mL) de todas as analisadas. A massa de  
1769 WTP042015 foi reduzida após o tratamento nas duas frações, ácida (2,910 µg/mL) e neutra  
1770 (2,930 µg/mL). Da amostragem realizada em 2017, WTP03T, pH ácido, foi a que apresentou  
1771 maior massa (3,950 µg/mL). Observou-se ainda um aumento da massa após ser realizado  
1772 tratamento da água nos seguintes extratos: WTP01 ácido (de 0,840 µg/mL para 1,480 µg/mL)  
1773 e neutro (de 1,270 µg/mL para 1,320 µg/mL); WTP02 neutro (de 0,950 µg/mL para 3,270  
1774 µg/mL) e WTP03 ácido (de 2,700 µg/mL para 3,950 µg/mL).

1775

### 1776 **3.2. Análises químicas: Micropoluentes emergentes**

1777 O diagnóstico dos contaminantes emergentes foi realizado a partir de ferramentas  
1778 analíticas capazes de detectar até mesmo concentrações muito baixas desses compostos. Na  
1779 Tabela 3 estão relacionados os MEs por categoria, observados nas WTPs estudadas. As  
1780 amostras das águas brutas apresentaram as maiores concentrações de micropoluentes  
1781 emergentes em quase todos os locais comparadas com as de água tratada. Em ordem

1782 decrescente, os valores totais de MEs mais elevados foram detectados na WTP04 com  
1783 12,991 $\mu\text{g L}^{-1}$ , seguida da WTP02 (7,341  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), WTP03 (7,050  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) e WTP01 (6,578  $\mu\text{g}$   
1784  $\text{L}^{-1}$ ).

1785 Dentre os microcompostos analisados, verificou-se que as maiores concentrações foram  
1786 determinadas para a cafeína, presente em quase todas as WTPs e com valores variando de  
1787 1,156  $\mu\text{g L}^{-1}$  na WTP02 a 1,647 $\mu\text{g L}^{-1}$ , na WTP01. Além da cafeína, nestas amostras foram  
1788 encontrados outros fármacos e pesticidas. Na WTP04 os fármacos detectados com maiores  
1789 concentrações foram o Paracetamol (2,114  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), Diclofenaco de sódio (1,895  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) e  
1790 ácido salicílico (1,796  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). Neste local, também foram encontrados pesticidas, como 2-  
1791 nitrofenol, em maior concentração (1,103  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) e Fenol (1,136  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). A tetraciclina e a  
1792 atrazina foram os compostos de menor abrangência, sendo o último encontrado apenas na  
1793 WTP04. Em Triunfo - WTP03, o ácido salicílico (1,493  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), a cafeína (1,347  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) e o  
1794 paracetamol (1,104  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) foram os poluentes de maior predominância.

1795 Assim como nas amostras de água bruta, a categoria dominante de MEs analisados na  
1796 água tratada foi a dos fármacos presentes nas diferentes cidades. Dentre os contaminantes  
1797 detectados, os fármacos como: a cafeína, o ácido salicílico e o paracetamol foram os mais  
1798 abundantes em 100 % das amostras. O tratamento como um todo apresentou eficiência de  
1799 remoção em torno de 23,1% a 45,3 %, sendo que os valores variaram de 3,977  $\mu\text{g L}^{-1}$  na  
1800 WTP02 a 7,113  $\mu\text{g L}^{-1}$  em WTP04. Neste último local de captação, onde foram detectadas  
1801 concentrações mais elevadas de ME, foi possível observar em ordem decrescente, predomínio  
1802 da cafeína (1,394 $\mu\text{g L}^{-1}$ ), seguida de Paracetamol (1,037  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), Amoxicilina (0,904  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) e  
1803 Diclorofenaco de sódio (0,833  $\mu\text{g L}^{-1}$ ).

1804 **Tabela 2.** Mutagenicidade de amostras de água bruta e tratada das estações de tratamento de água das quatro cidades em revertentes por litro  
 1805 (rev / L) de água amostrada

1806

Amostra	TA98				TA100				<sup>a</sup> Citotoxicidade				
	-S9		+S9		-S9		+S9		-S9		+S9		
	N	A	N	A	N	A	N	A	N	A	N	A	
<b>Bruta</b>													
2017	WTP01	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	nc	nc	nc	nc
	WTP02	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	nc	nc	750	375
	WTP03	ns	277±89	184±37,7	166±29	ns	ns	ns	ns	nc	187,5	nc	nc
	WTP04	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	750	nc	nc	nc
<b>Tratada</b>													
2017	WTP01	ns	ns	ns	ns	94±32,1 <sup>i</sup>	ns	51±25,2 <sup>i</sup>	ns	nc	nc	nc	nc
	WTP02	30±10 <sup>i</sup>	ns	ns	ns	185±26,7	384±65,5	102±47,9	74±31,5	nc	nc	nc	nc
	WTP03	23±7,6	29±14	ns	ns	ns	83±26,7 <sup>i</sup>	ns	54±18,1	nc	750	nc	nc
	WTP04	21±6	40±9,3	ns	ns	253±147,1 <sup>i</sup>	1283±245,8	41±20,3	807±147,4	nc	nc	375	nc
2015	WTP04 <b>bruta</b>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	362±41,7	nc	nc	187,5	nc
	WTP04 <b>tratada</b>	28±10,3	27±14,1	ns	ns	1263±188,9	282±38,8	263±74,2	124±36,8	nc	nc	nc	nc

1807

1808 a: primeira dosagem citotóxica em ml de peso seco de água com dosagem de sobrevivência celular inferior a 60% comparada com controle  
 1809 negativo; ns – não significativa; nc – Não citotóxica; i: indicativo de mutagenicidade; N: pH natural; A: pH ácido; WTP = water treatment plant  
 1810 sites (ETAs)

1811

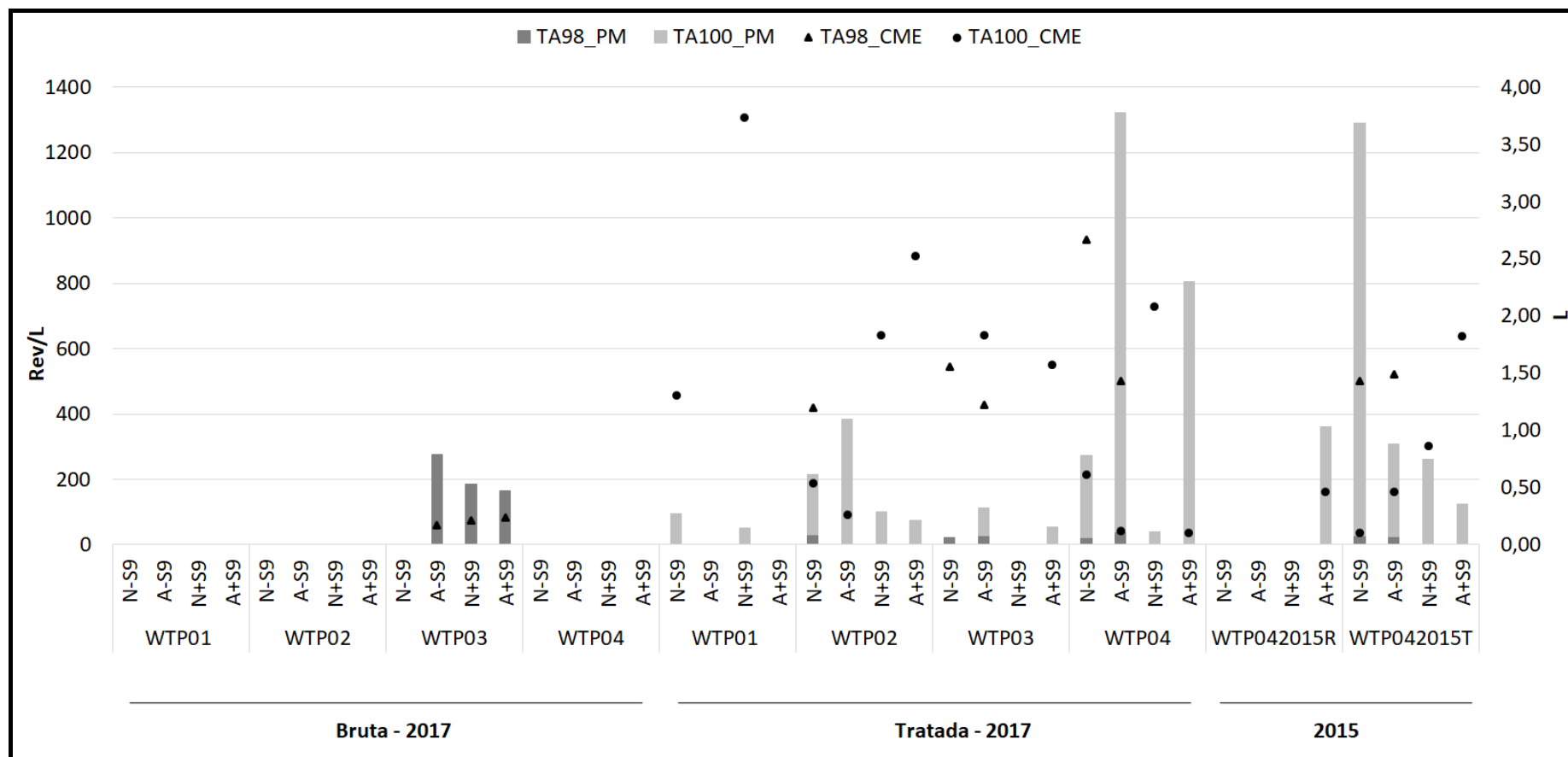
1812

1813

1814

1815

1816



1817

1818

1819 **Figura 2.** Comparação da sensibilidade das linhagens de *Salmonella* de acordo com a concentração mutagênica efetiva (CME em L) e a  
 1820 Potência Mutagênica (PM em rev / L) de amostras de água de abastecimento na ausência (-S9) e presença (+ S9) de ativação metabólica  
 (S9 humana *in vitro*).

1821

N: pH natural;

1822

A: pH ácido;

1823

WTP = water treatment plant sites (ETAs)

AI&RU

1825 Na WTP02 destaca-se como composto predominante o ácido salicílico com maiores  
1826 teores tanto na água bruta ( $1,1818 \mu\text{g L}^{-1}$ ) quanto na tratada ( $0,930 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Nos demais  
1827 locais, WTP01 e WTP03, os resultados foram semelhantes na maioria das amostras (Tabela  
1828 03).

1829

#### 1830 **4. Discussão**

1831 Este estudo buscou investigar a presença de compostos mutagênicos nas amostras de  
1832 água bruta e tratada, coletadas nas estações de tratamento. Esta região tem sido alvo de  
1833 pesquisas quanto à qualidade da água tratada, uma vez que em estudos anteriores foram  
1834 encontrados compostos mutagênicos em amostras de sedimento em dois destes locais de  
1835 captação de água (Ta032 e Ta006) (Costa et al., 2012; 2017; Gameiro, 2015; Gameiro et al.,  
1836 2018a; 2018b). Na fase atual da pesquisa foi detectado decréscimo na contribuição de HPAs  
1837 e metais pesados para explicar o potencial mutagênico de sedimento, descritos em estudos  
1838 anteriores, como estressores principais e secundários deste manancial (Gameiro, 2019). Isto  
1839 gera um alerta quanto à natureza da mistura complexa de poluentes desta região. Resultados  
1840 significativos de mutagenicidade da água tratada foram encontrados nas quatro estações de  
1841 tratamento. Entretanto, as respostas das amostras da WTP04 foram as mais expressivas  
1842 comparadas com as dos outros locais da presente amostragem de 2017 e persistentes com a  
1843 de dois anos anteriores (2015). Comparando os valores das duas amostragens realizadas na  
1844 WTP04, houve uma diferença no padrão das respostas encontradas pela linhagem TA100  
1845 sem S9. Em 2015 foi observada potência mutagênica de  $282 \pm 38,8$  rev/L na fração ácida e  
1846  $1263 \pm 188,9$  rev/L na fração neutra, enquanto em 2017 os valores foram inversos,  
1847  $1283 \pm 245,8$  rev/L na fração ácida e  $253 \pm 147,1$  rev/L na fração neutra.

1848 **Tabela 3.** Concentração de micropoluentes presentes nas estações de tratamento de água das cidades banhadas pelo Rio Taquari.

Categorias	Compostos	Amostras ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )							
		WTP01		WTP02		WTP03		WTP04	
		Bruta	Tratada	Bruta	Tratada	Bruta	Tratada	Bruta	Tratada
<b>Fármacos</b>									
Analgésicos e anti-Inflamatórios									
	Diclofenaco Sodio	0,532±0,01	0,202±0,01	0,7553± 0,06	0,346 ±0,02	0,856 ±0,02	0,653± 0,06	1,895± 0,41	0,833± 0,06
	Paracetamol	0,810±0,05	0,6310±0,05	1,13 ± 0,001	0,74±0,002	1,104±0,03	1,02 ± 0,13	2,11358±0,23	1,037 ± 0,01
	Ácido salicílico	1,273±0,02	1,0373±0,2	1,1818±0,02	0,93±0,03	1,493±0,03	1,0218±0,2	1,7962±0,29	0,618±0,02
	Antibióticos								
	Amoxicilina	0,216±0,03	0,116±0,03	0,354± 0,01	0,14±0,02	0,304±0,02	0,254± 0,01	0,901±0,06	0,904± 0,1
	Tetraciclina	0,107±0,04	nd	nd	nd	0,145±0,04	0,104±0,03	0,3677±0,05	0,105± 0,05
	Estimulante								
	Cafeína	1,647± 0,02	1,073± 0,02	1,156 ± 0,03	0,84±0,04	1,347±0,04	1,056 ± 0,03	1,512 ± 0,12	1,394 ± 0,3
<b>Pesticidas</b>									
	Atrazina	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,734 ±0,045	0,272±0,04
	Diuron	0,266±0,001	0,1235±0,05	0,513±0,003	0,163±0,03	0,45±0,03	0,243±0,03	0,805±0,002	0,13±0,003
	2-nitrofenol	0,681±0,004	0,4881±0,04	0,7310±0,2	0,506±0,02	0,706±0,02	0,510±0,02	1,103±0,11	0,810±0,02
	4-nitrofenol	0,304±0,03	0,104±0,03	0,893±0,01	0,169± 0,03	0,202±0,03	0,183±0,01	0,627±0,02	0,583±0,01
<b>Outros</b>									
	Fenol	0,742±0,02	0,442±0,02	0,627±0,02	0,143±0,05	0,443±0,05	0,378±0,02	1,136±0,38	0,427±0,02
<b>Total</b>		<b>6,578</b>	<b>4,217</b>	<b>7,341</b>	<b>3,977</b>	<b>7,050</b>	<b>5,423</b>	<b>12,991</b>	<b>7,113</b>

1849 ND: não detectada; Análises feitas em replicatas (n= 3); WTP = water treatment plant sites (ETAs).



1850 Segundo De Marini et al., (1995), muitos DBPs gerados durante a cloração da água  
1851 são mutágenos detectados principalmente na fração de pH ácida pelas linhagens TA98 e  
1852 TA100 sem S9, sendo mais mutagênicos na TA100. O procedimento de extração dos  
1853 compostos com resina XAD e a acidificação das amostras em pH 2 permite a adsorção de  
1854 compostos mutagênicos, como no caso de alguns DBPs (MX, por exemplo) (IARC, 1991;  
1855 Rezemini et al., 2008). Assim, os resultados observados na água tratada dos extratos ácidos  
1856 podem ter sido causados por DBPs.

1857 A presença de mutagenicidade mais elevada nos extratos neutros em relação aos  
1858 ácidos, como detectado em WTP01 ( $94 \pm 32,1$  rev/L) e WTP04T2015 ( $1263 \pm 188,9$  rev/L) não  
1859 são esperadas como resposta aos DBPs e podem indicar interferência antrópica. Gameiro  
1860 (2019) sugerem que os locais de captação de água para estas estações estão sob influência  
1861 industrial (Ta063) e agrícola (Ta063 e Ta006). No local de captação Ta006, recebe ainda  
1862 influência da área com solo contaminado por preservantes de madeira (Pohren et al., 2012;  
1863 Costa et al., 2012; 2017; Gameiro et al.; 2018a). A amostragem de 2015 em WTP04 foi  
1864 realizada após o processo de intervenção para retirada das principais fontes ativas de  
1865 contaminação presentes no solo da área 4 km a montante de Ta006. A partir desta atividade,  
1866 contaminantes poderiam ter sido escoados até o local Ta006 do Rio Taquari (Gameiro et al.,  
1867 2018a) comprometendo a água captada pela WTP04. Assim, mostrando a diferença no padrão  
1868 de mutagenicidade encontrada na porção neutra da água potável de WTP04T2015.

1869 A mutagenicidade de alguns compostos só é detectada após serem metabolizados pelo  
1870 organismo, porém, a adição da mistura S9, que contém a enzima citocromo P450 responsável  
1871 pela atividade metabólica, demonstrou reduzir a mutagenicidade dos extratos de água tratada  
1872 com cloro (Bedoya et al., 2012). Segundo Bedoyo e colaboradores, a redução no potencial  
1873 mutagênico das amostras de água tratada na Colômbia foi de 51% em ensaios com a linhagem

1874 TA98 e 68% para TA100 na presença de S9, indicando que as substâncias presentes nos  
1875 extratos (DBPs) eram de ação direta (-S9). Nossos resultados mostraram redução da  
1876 mutagenicidade na presença de S9 concordando com o estudo realizado por nosso grupo de  
1877 pesquisa (Pereira et al., 2007) e outros estudos da literatura (Backlund et al. 1985, Park et al.,  
1878 2000; Bedoya et al., 2012). Nossos resultados mostraram que a utilização de frações S9  
1879 humanas permitiu prever o metabolismo dos compostos mutagênicos em humanos,  
1880 concordando com Hakura et al. (2005), uma vez que reproduzem a resposta com mais  
1881 fidelidade.

1882         Em ensaios realizados na água bruta, da amostragem de 2017, foi possível verificar  
1883 atividade mutagênica apenas no local WTP03, detectada pela linhagem TA98, sensível a  
1884 compostos que causam erro no quadro de leitura. As respostas foram tanto na presença quanto  
1885 na ausência de metabolização, porém a mais elevada foi em ensaio direto do extrato ácido  
1886 ( $277 \pm 89$  rev/L). Este resultado permitiu a classificação desta região como pouco mutagênica  
1887 ( $<500$  rev/L) comparada com o ranking de resultados compilados de monitoramento da  
1888 qualidade da água de superfície em águas residuais (Umbuzeiro et al., 2001; Ohe et al., 2004).  
1889 Assim como a linhagem TA100 é reconhecida na literatura como a mais sensível em ensaios  
1890 *Salmonella* de amostras de água tratada (De Marini et al., 1995), a TA98 é amplamente  
1891 utilizada para testar água e sedimentos dos rios (Chen e White, 2004; Ohe et al., 2003; 2004).

1892         Os resultados significativos da água bruta em WTP03 mostraram um decréscimo de 90  
1893 a 100% após o tratamento da água. Além disso, esta amostra, antes do tratamento, foi a mais  
1894 citotóxica (na dosagem 187,5 ml) comparada com as demais, mostrando complexidade das  
1895 interações causadas por compostos perigosos encontrados no meio aquático. O ponto de  
1896 entrada de água (Ta011) para tratamento (WTP03) está localizado 1 km a montante da antiga  
1897 usina de tratamento de madeira, de modo que não se espera influência na qualidade da água

1898 devido à contaminação presente na área. No estudo de Coronas et al. (2016) não foi  
1899 encontrada mutagenicidade da água neste local, antes e depois do tratamento, amostrada em  
1900 janeiro de 2010.

1901 A amostra de WTP04T2015 apresentou resposta significativa para água bruta, porém  
1902 detectadas pela TA100+S9,  $362 \pm 41,7$  rev/L e decrescendo para  $124 \pm 36,8$  rev/L na água  
1903 tratada. As demais amostras de água bruta não foram mutagênicas e similares com resultados  
1904 encontrados em outros trabalhos (Meier, 1988; Liu et al., 1999; Warren et al., 2015). Em  
1905 casos que ocorre aumento da mutagenicidade na água tratada comparada com a bruta sugere-  
1906 se que a adição de cloro seja responsável pelos resultados significativos (Park et al., 2000).  
1907 Somando aos dados de mutagenicidade, este estudo realizou cálculo da mutação efetiva que  
1908 indica o nível máximo de rev/placa, sem e com ativação metabólica, para gerar o dobro da  
1909 mutação espontânea. Ao calcular o CME, observamos que houve uma variação de resposta  
1910 entre as linhagens estudadas. No ranking de mutagenicidade das amostras foi possível  
1911 observar que a WTP04, após tratamento, apresentou CME menor (0,103 L), nas amostragens  
1912 de 2017 e 2015, ou seja, estas amostras foram as mais mutagênicas, em menores  
1913 concentrações, detectadas pela linhagem TA100.

1914 A ocorrência de micropoluentes no ambiente aquático foi revisada em recentes estudos  
1915 de 2008 a 2014 por Luo et al. (2014) que relataram suas concentrações em diferentes tipos de  
1916 águas, incluindo águas residuais, águas superficiais, águas subterrâneas e água potável. Entre  
1917 os locais estudados neste trabalho, a maior concentração de MEs foi detectada na WTP04 -  
1918 em General Câmara, com  $12,991 \mu\text{g L}^{-1}$ . Nas demais estações as concentrações totais foram  
1919 WTP02 ( $7,341 \mu\text{g L}^{-1}$ ), WTP03 ( $7,050 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e WTP01 ( $6,578 \mu\text{g L}^{-1}$ ). A presença desses  
1920 MEs está relacionada com as atividades antrópicas desenvolvidas nas regiões próximas às  
1921 ETAs (Vettorello et al., 2017).

1922 As maiores concentrações encontradas na água bruta foram determinadas para a  
1923 cafeína, presentes em todas as WTPs e com valores variando de 1,156  $\mu\text{g L}^{-1}$  na WTP02 a  
1924 1,647 $\mu\text{g L}^{-1}$ , na WTP01. Sua presença nos mananciais está diretamente relacionada com o  
1925 aporte de esgoto doméstico nos corpos d'água. Em países onde o problema de coleta e  
1926 tratamento de esgoto já foi equacionado, a presença de cafeína nos corpos d'água está  
1927 relacionada com a eficiência das estações de tratamento de esgoto, que são capazes de  
1928 remover entre 80 e 99 % desses contaminantes, dependendo do tipo de tratamento que é  
1929 aplicado (Raimundo, 2011). A cafeína, o ácido salicílico e o paracetamol foram os mais  
1930 abundantes em 100 % das amostras. O tratamento como um todo apresentou eficiência de  
1931 remoção em torno de 23,1% na WTP03 a 45,3 % na WTP04, sendo que os valores variaram  
1932 de 5,423  $\mu\text{g L}^{-1}$  a 7,113  $\mu\text{g L}^{-1}$ . As concentrações de cafeína foram baixas comparadas com as  
1933 reportadas em outros mananciais brasileiros que são em níveis de centenas de  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Desta  
1934 forma, Frohener et al. (2010) determinaram concentrações entre 1,4 e 753,5  $\mu\text{g L}^{-1}$  em  
1935 mananciais na região de Curitiba (PR) e Gonçalves (2008) determinou concentrações entre  
1936 0,2 e 47,5  $\mu\text{g L}^{-1}$  em Teresópolis (RJ). Em Campinas, o histórico de contaminação desses  
1937 mananciais por cafeína aponta concentrações entre 0,2 e 127  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Montagner e Jardim,  
1938 2011). Nos EUA e Canadá, as concentrações determinadas em regiões densamente povoadas  
1939 relatadas na literatura, não ultrapassam 0,225  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Wang et al., 2011; Focazio, et al., 2008;  
1940 Conley et al., 2008; Stackelberg et al., 2007; Chen et al., 2006). Para países como Itália,  
1941 Alemanha, França e Espanha são reportados valores de cafeína nos mananciais de até 3  $\mu\text{g L}^{-1}$ ,  
1942 dependendo da região (Loos et al., 2007; Musolff et al., 2009; Togola & Budzinski, 2008;  
1943 Fernandez et al., 2010; Huerta-Fontela et al., 2007).

1944 Entre os fármacos com maiores concentrações destacaram-se o Paracetamol (2,114  $\mu\text{g}$   
1945  $\text{L}^{-1}$ ), Diclofenaco de sódio (1,895  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) e ácido salicílico (1,796  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) em WTP04; e, o

1946 ácido salicílico ( $1,493 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e o paracetamol ( $1,104 \mu\text{g L}^{-1}$ ) na WTP03. Como  
1947 medicamentos ingeridos via oral são metabolizados no corpo humano e subsequentemente  
1948 excretados pela urina e fezes, sua taxa de excreção desempenha um papel importante na  
1949 introdução desses produtos nas águas brutas. O diclofenaco, por exemplo, possui baixas taxas  
1950 de excreção e baixos níveis dele significam que as baixas taxas de excreção são compensadas  
1951 pelo uso massivo deste composto (Luo et al., 2014). Além disso, as doenças comuns locais  
1952 podem induzir um maior consumo de produtos farmacêuticos específicos em determinados  
1953 períodos. Pesquisas mostraram que condições climáticas podem causar entrada flutuante de  
1954 micropoluentes (Kolpin et al., 2002). No País de Gales e Reino Unido o paracetamol foi  
1955 detectado em níveis altos em águas residuais brutas ( $> 10 \mu\text{g/L}$ ) e isso pode ser explicado pelas  
1956 altas quantidades de seu descarte (Kasprzyk-Hordern et al., 2008).

1957 Em WTP04 foram encontrados valores mais elevados para as pesticidas, como: 2-  
1958 nitrofenol, em maior concentração ( $1,103 \mu\text{g L}^{-1}$ ), Diuron ( $0,805 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e Fenol ( $1,136 \mu\text{g L}^{-1}$ ).  
1959 A atrazina foi detectada apenas na WTP04 ( $0,734 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Esta é um dos herbicidas mais  
1960 consumidos no Brasil (IBAMA, 2010). Usada no combate a plantas infestantes e aplicada em  
1961 inúmeras culturas, rodovias e linha férreas. Além disso, é o único pesticida regulamentado nas  
1962 águas superficiais no Brasil com uma concentração máxima permitida de  $2 \mu\text{g L}^{-1}$  (Brasil,  
1963 2005). Apesar de ser bastante estável no ambiente, a presença deste herbicida nos corpos  
1964 d'água está relacionada com a lixiviação de solos agrícolas e, por isso, pode haver um  
1965 aumento na concentração dela em períodos chuvosos, o que aconteceu na amostra WTP04  
1966 (Raimundo, 2011). Assim como nos mananciais, dentre os contaminantes detectados na água  
1967 tratada, a cafeína foi a que apresentou maior concentração em todas as WTPs, com valores  
1968 variando de  $0,840 \mu\text{g L}^{-1}$ , na WTP02 a  $1,349 \mu\text{g L}^{-1}$ , na WTP04. Trabalhos descritos na  
1969 literatura reportam concentrações menores que as determinadas neste trabalho, entre  $0,012$  e

1970 0,181  $\mu\text{g L}^{-1}$  na Itália, França, EUA e Canadá (Loos et al., 2007; Togola e Budzinski, 2008;  
1971 Stackelberg et al., 2007; Wang et al., 2011; Chen et al., 2006). O ácido salicílico também foi  
1972 detectado com teores mais elevados em relação a outros compostos, variando de 0,618  $\mu\text{g L}^{-1}$ ,  
1973 na WTP04 a 1,037  $\mu\text{g L}^{-1}$ , na WTP01. Nossos valores indicaram estar um pouco acima da  
1974 faixa encontrada em outros trabalhos, ND a 0,50  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Gracia-Lor et al., 2012; Kasprzyk-  
1975 Hordern et al., 2009; Stamatis & Konstantinou, 2013).

1976 A presença de MEs, na água bruta e na tratada, mostra que a maioria destes, com  
1977 exceção do pesticida atrazina, não estariam contribuindo na mutagênese detectada pelo ensaio  
1978 *Salmonella*, já que as amostras brutas foram quase todas negativas. Entretanto, após  
1979 tratamento, a mutagenicidade foi encontrada em todas as ETAS. Segundo a literatura  
1980 (Glassmeyer & Shoemaker, 2005; Bedner & MacCrehan, 2006a, 2006b) alguns fármacos  
1981 como paracetamol, mais especificamente seu princípio ativo, o acetaminofeno, além do  
1982 diclofenaco, podem reagir com cloro formando numerosos DBPs, alguns considerados  
1983 tóxicos. Assim, a formação de DBPs a partir da reação com MEs, bem como a persistência de  
1984 MEs após tratamento, serve de alerta para órgãos ambientais quanto a fiscalização e uso  
1985 destes, pois muitos produtos são de uso pessoal e descartados de forma inadequada nos  
1986 recursos hídricos.

## 1987 **5. Conclusão**

1988 A crescente preocupação científica sobre a presença de micropoluentes orgânicos em  
1989 ambientes aquáticos e seus potenciais riscos têm sido amplamente avaliada nos últimos anos,  
1990 principalmente nos países desenvolvidos. Uma variedade de metodologias vem sendo  
1991 desenvolvidas para melhorar a eficiência na remoção dos resíduos tóxicos e genotóxicos,  
1992 porém na maioria dos países a adoção destes procedimentos ainda está distante. Neste  
1993 trabalho foi verificada a presença de mutagenicidade, detectada pelo ensaio

1994 *Salmonella*/microsoma, nas amostras de água tratada de todas as WTPs. Na água bruta,  
1995 apenas a WTP03 foi mutagênica. Através dos resultados significativos encontrados na água  
1996 tratada foi possível concluir que a presença dos contaminantes nas águas das quatro WTPs  
1997 está relacionada ao processo de tratamento da água utilizado. Em WTP04, antes e depois do  
1998 tratamento, foram encontrados resultados mais expressivos para potências mutagênicas e  
1999 concentrações de micropoluentes. Respostas também foram encontradas nos demais locais,  
2000 porém com menores valores. Nossos resultados de MEs indicaram que, embora tenham  
2001 apresentado uma redução destes compostos nas águas tratadas em relação às brutas, eles ainda  
2002 estiveram presentes nas águas distribuídas para população. Além disso, a maioria dos MEs,  
2003 com exceção da atrazina, não contribuíram na mutagênese detectada pelo ensaio *Salmonella*,  
2004 já que as amostras brutas foram quase todas negativas. Entretanto, após tratamento, a  
2005 mutagênese foi encontrada em todas as ETAS, podendo os MEs também estarem reagindo  
2006 com o cloro, contribuindo na formação de DBPs mutagênicos com padrão diferente do  
2007 esperado, após o tratamento convencional. A cafeína foi encontrada em todas as amostras e  
2008 em maiores concentrações, após tratamento, em relação aos outros compostos analisados.  
2009 Como ela é considerada também um marcador químico de qualidade ambiental, verificou-se  
2010 que nas regiões estudadas não apresentam tratamento e destino de esgoto adequado, sendo  
2011 dessa forma, uma importante fonte de contaminação no Rio Taquari. Assim, a elaboração de  
2012 diretrizes que inclua os contaminantes emergentes é fundamental, pois permitiria que as  
2013 agências regulatórias ambientais e órgãos do governo estabelecessem melhores padrões para a  
2014 preservação da vida aquática, conservação dos mananciais e potabilidade da água distribuída à  
2015 população.

2016

2017 **Declaração de Contribuições do Autor**

2018 Paula escreveu o manuscrito com importante contribuição intelectual do PhD. Vera. O  
2019 estudante de graduação Kauê auxiliou nas coletas das amostras, extrações dos compostos  
2020 orgânicos e nos testes de *Salmonella*/microsossoma. Tatiana e Flávio realizaram as análises  
2021 químicas. Todos os autores aprovaram o manuscrito final.

2022 **Agradecimentos**

2023 Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível  
2024 Superior (CAPES) pela bolsa de doutorado cedida a Paula Hauber Gameiro e ao Conselho  
2025 Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela bolsa de iniciação científica de  
2026 Kauê Hohn Assis, Ismael Pescke e Lívia Rozino. Agradecimentos também à Vanda Garibotti,  
2027 da Divisão de Vigilância Ambiental de Saúde pela permissão ao acesso nas Estações de  
2028 Tratamento de Água para realização das coletas. Este trabalho foi financiado Conselho  
2029 Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Processos CNPq 307884/2011-2 e  
2030 CNPq 479566/2012-7).

2031

2032

2033

2034

2035

2036



2037 **6. Referências**

- 2038 Appel, JSL, Terescova, V, Rodrigues, VCB, Varga, VMF. 2007. Aspectos toxicológicos do  
2039 preservativo de madeira CCA (arseniato de cobre cromato): revisão. *Rev. Bras. Toxicol.*  
2040 19, 29 – 43 (in Portuguese).
- 2041 ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 2008. Resumende Salud  
2042 Pública—Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos. Available:/http://www.  
2043 atsdr.cdc.gov/es/phs/es phs69.pdf.
- 2044 Backlund, P., Kronberg, L., Pensar, G., Tikkanen, L. 1985. Mutagenic activity in humic water  
2045 and alum flocculated humic water treated with alternative disinfectant. *Science of the*  
2046 *total environment.* 47, 257-264.
- 2047 Bedoya, E.R., Velasquez, N., Quijano, J., Bravo-linares, C. 2012. Mutagenicity and  
2048 Genotoxicity of water treated for human consumption induced by chlorination by-  
2049 products. National Environmental Health Association
- 2050 Bedner, M., MacCrehan, W.A., 2006a. Reactions of the amine-containing drugs fluoxetine  
2051 and metoprolol during chlorination and dechlorination processes used in wastewater  
2052 treatment. *Chemosphere* 65, 2130–2137.
- 2053 Bedner, M., MacCrehan, W.A., 2006b. Transformation of acetaminophen by chlorination  
2054 produces the toxicants 1,4-benzoquinone and n-acetyl-pbenzoquinone imine. *Environ.*  
2055 *Sci. Technol.* 40, 516–522.
- 2056 Benotti, M.J., Trenholm, R.A., Van der Ford, B.J., Holady, J.C., Stanford, B.D., Snyder, S.A.  
2057 2009. Pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in U.S. drinking water.  
2058 *Environ. Sci. Technol.* 43, p 597.
- 2059 Bernstein, L., Kaldor, J., Mccann, J., Pike, M.C. 1982. An empirical approach to the statistical  
2060 analysis of mutagenesis data from the Salmonella test, *Mutat. Res.* 97, 267–287.
- 2061 Boorman, G.A., Dellarco, V., Dunnick, J.K., Chapin, R.E., Hunter, S., Hauchman, F.,  
2062 Gardner, H., Cox, M., Sills, R.C. 1999. Drinking water disinfection byproducts: review  
2063 and approach to toxicity evaluation, *Environ. Health Perspect.* 107, 207–217.
- 2064 Bodzek, M., Dudziak, M. 2006. Elimination of steroidal sex hormones by conventional water  
2065 treatment and membrane processes. *Desalination.* 198., p 24.
- 2066 Brasil. 2005. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução CONAMA nº 357 de 17 de  
2067 março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais  
2068 para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento  
2069 de efluentes, e dá outras providências. Aavailable. <http://www.mma.gov.br/conama> (in  
2070 Portuguese).
- 2071 Cardozo, T.R., Rosa,D.P., Feiden, I.R., Rocha, J.A.V., Oliveira, N.C.A., Pereira, T.S.P.,  
2072 Pastoriza, T.F., Marques, D.M., Lemos, C.T.L. Terra, N.R., Vargas, V.M.F. 2006.  
2073 Genotoxicity and toxicity assessment in urban hydrographic basins. *Mutat Res.* 603, 83–  
2074 96.
- 2075 Chen, G., White, P.A. 2004. The mutagenic hazards of aquatic sediments: a review. *Mutat.*  
2076 *Res.* 567, 151-225.
- 2077 Chen, M., Ohman, K., Metcalfe, C., Ikonoumou, M.G., Amatya, P.L., Wilson, J. 2006.  
2078 Pharmaceuticals and endocrine disruptors in wastewater treatment effluents and in the  
2079 water supply system of Calgary, Alberta, Canada. *Water Qual. Res. J. Canada.* 41, p.351.
- 2080 Conley, J.M., Symes, S.J., Schorr, M.S., Richards, S.M. 2008. Spatial and temporal analysis  
2081 of pharmaceutical concentrations in the upper Tennessee River basin. *Chemosphere.* 73,  
2082 p.1178.

2083 Coronas, M.V., Rocha, J.A.V., Salvadori, D.M.F., Vargas, V.M.F., 2016. Evaluation of area  
2084 contaminated by wood treatment activities: Genetic markers in the environment and in  
2085 the child population. *Chemosphere* 144, 1207-1215.

2086 Cortés, C, Marcos, R. 2018. Genotoxicity of disinfection byproducts and disinfected waters:  
2087 A review of recent literature. *Mutat Res Gen Tox En.* 831, 1–12.

2088 Costa et al., 2012; Costa, T.C., Brito, K.C.T., Rocha, J.A.V., Leal, K. A., Rodrigues, M.L.K.,  
2089 Minella, J.P.G., Matsumoto, S.T., Vargas, V.M.F. 2012. Run off of genotoxic compounds  
2090 in river basin sediment under the influence of contaminated soils. *Ecotox. Environ.* 75,  
2091 63–72.

2092 Costa, T.C., Brito, K.C.T., Rocha, J.A.V., Leal, K. A., Rodrigues, M.L.K., Minella, J.P.G.,  
2093 Matsumoto, S.T., Vargas, V.M.F. 2017. Corrigendum to: Runoff of genotoxic  
2094 compounds in river basin sediment under the influence of contaminated soils [*Ecotoxicol.*  
2095 *Environ. Saf.* 75 (2012) 63–72]. *Ecotox. Environ.* 143, 351–352.

2096 De Marini, D.M., Abu-Shakra, A., Felton, C.F., Patterson, K.S., Shelton, M.L., 1995.  
2097 Mutation spectra in Salmonella of chlorinated, chloraminated, or ozonated drinking water  
2098 extracts: comparison to MX. *Environ. Mol. Mutagen.* 26, 270–285.

2099 Fernandez, C., González-Doncel, M., Pro, J., Carbonell, G., Tarazona, J.V. 2010. Occurrence  
2100 of pharmaceutically active compounds in surface waters of the Henares-Jarama-Tajo  
2101 River system (Madrid, Spain) and a potential risk characterization. *Sci. Total Environ.*  
2102 408, p.543. Huerta-Fontela, M., Galceran, M.T., Ventura, F. 2011. Occurrence and  
2103 removal of pharmaceuticals and hormones through drinking water treatment. *Water Res.*  
2104 45, p.1432.

2105 Focazio, M.J., Kolpin, D.W., Barnes, K.K., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Zaugg, S.D., Barber,  
2106 L.B., Thurman, M.E. 2008. A national reconnaissance for pharmaceuticals and other  
2107 organic wastewater contaminants in the United States - II) Untreated drinking water  
2108 sources. *Sci. Total Environ.* 402, p201.

2109 Froehner, S., Souza, D.B., Machado, K.S., Rosa, E.C. 2010. Tracking anthropogenic inputs in  
2110 Barigui River, Brazil using biomarkers. *Water Air Soil Pollut.* 210, p.33.

2111 Gameiro, PH. Qualidade ambiental da sub-bacia do Baixo Taquari influenciada por sítio  
2112 contaminado em processo de remediação 100 f. Dissertação de Mestrado (Ecologia) –  
2113 Instituto de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Universidade Federal  
2114 do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015. (in portuguese)

2115 Gameiro, PH, Pereira, NC, Rocha, JAV, Leal, KA, Varga, VMF. 2018a. Assessment of  
2116 Sediment Mutagenicity in Areas under the Influence of a Contaminated Site Undergoing  
2117 a Remediation Process. *Environ. Mol. Mutagen.* 59, 625-638.

2118 Gameiro, PH, Pereira, NC, Rocha, JAV, Leal, KA, Vargas, VMF. 2018b. PAHs as quality  
2119 markers of the sediments in the Lower Taquari sub-basin during the period of  
2120 intervention in a contaminated site. *Ecotoxicol. Environ. Contam.* 13(2), 19-23.

2121 Glassmeyer, S.T., Shoemaker, J.A., 2005. Effects of chlorination on the persistence of  
2122 pharmaceuticals in the environment. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 74, 24–31.

2123 Gonçalves, E.S. 2008. Uso da Cafeína como Indicador de Contaminação por Esgoto  
2124 Doméstico em Águas Superficiais; Dissertação de mestrado; Universidade Federal  
2125 Fluminense, 90 pp.

2126 Gracia-Lor ,E., Sancho, J.V., Serrano, R., Hernández, F. 2012. Occurrence and removal of  
2127 pharmaceuticals in wastewater treatment plants at the Spanish Mediterranean area of  
2128 Valencia. *Chemosphere.*87, 453-462.

2129 Grellier, J., Rushton, L., Briggs, D.J., Nieuwenhuijsen, M.J. 2015. Assessing the human  
2130 health impacts of exposure to disinfection by-products – a critical review of concepts and  
2131 methods, *Environ. Int.* 78, 61–81, <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2015.02.003>.

2132 Guillén, D, Ginebreda, A, Farré, M, Darbra, RM, Petrovic, M, Gros, M, Barceló, D. 2012.  
2133 Prioritization of chemicals in the aquatic environment based on risk assessment:  
2134 analytical, modeling and regulatory perspective. *Sci. Total Environ.* 440, 236-252.

2135 Huerta-Fontela M., Galceran M.T., Ventura F. 2007. Ultrapformance liquid  
2136 chromatography-tandem mass spectrometry analysis of stimulatory drugs of abuse in  
2137 wastewater and surface waters; *Anal. Chem.* 79, p.3821.

2138 IARC - Internacional Agency for Reserch on Câncer. 1991. Monographs on the evaluation of  
2139 carcinogenic risks to humans: occupational exposures in insecticide application, and  
2140 some pesticides. Pentachlorophenol. Lyon. 53, 371- 402.

2141 IARC - Internacional Agency for Reserch on Câncer. 1999a. Monographs on the Evaluation  
2142 of Carcinogenic Risks to Humans. Some Chemicals that Cause Tumours of the Kidney or  
2143 Urinary Bladder in Rodents and Some Other Substances, vol. 73, Lyon,France.

2144 IARC - Internacional Agency for Reserch on Câncer. 1999b. Re-evaluation of Some Organic  
2145 Chemicals, Hydrazine and Hydrogen Peroxide, vol. 71, Lyon, France.

2146 IBAMA – Instituto Brasileiro do meio Ambiente e dos Recursos Renováveis (2010) Produtos  
2147 agrotóxicos e afins comercializados em 2009 no Brasil – uma abordagem ambiental;  
2148 Aavailable: <http://www.ibama.gov.br> (in portuguese)

2149 IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Censo 2019.

2150 Kado, N., Guirguis, G., Flessel, C., Chan, R., Chang, K., Wesolowski, J. 1986. Mutagenicity of  
2151 fine (less than 2.5 microns) airborne particles: diurnal variation in community air  
2152 determined by a Salmonella micro preincubation (microsuspension) procedure. *Environ.*  
2153 *Mutagen.* 8, 53-66.

2154 Kasprzyk-Hordern, B., Dinsdale, R.M., Guwy, A.J. 2008. The occurrence of pharmaceuticals,  
2155 personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs in surface water in South  
2156 Wales, UK. *Water Res.* 42, p.3498.

2157 Kasprzyk-Hordern, B., Dinsdale, R.M., Guwy, A.J. 2009. The removal of pharmaceuticals,  
2158 personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs during wastewater treatment  
2159 and its impact on the quality of receiving waters. *Water Res.* 43, 363-380.

2160 Kolpin, D. W., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Thurman, E.M., Zaugg, S.D., Barber, L.B.,  
2161 Buxton, H.T. 2002. Pharmaceuticals, hormones and other organic wastewater  
2162 contaminants in U.S. streams, 1999-2000: A national reconnaissance. *Environ. Sci.*  
2163 *Technol.* 36, p.1202.

2164 Legay, C., Rodriguez, M.J., Sérodes, J.B., Levallois, P; 2010. Estimation of chlorination by-  
2165 products presence in drinking water in epidemiological studies on adverse reproductive  
2166 outcomes: A review. *Science of the Total Environment.* 408, 456–472

2167 Lemos, A.T., Rosa, D.P., Rocha, J.A.V., Vargas, V.M.F., 2009. Mutagenicity assessment in a  
2168 river basin influenced by agricultural, urban and industrial sources. *Ecotoxicol. Environ.*  
2169 *Saf.* 72, 2058–2065.

2170 Liu, Q., Jiao, Q.C., Hung, X.M., Cui, S.Q., Yao, G.H., Ziang, Z.R., Zhao, H.K., Wang, N.Y.  
2171 1999. Genotoxicity of drinking water from Chao Lake, *Environ. Res.* 127–131.

2172 Loos, R., Wollgast, J., Huber, T., Hanke, G. 2007. Polar herbicides, pharmaceutical products,  
2173 perfluorooctanesulfonate (PFOS), perfluorooctanoate (PFOA), and nonylphenol and its  
2174 carboxylates and ethoxylates in surface and tap waters around Lake Maggiore in  
2175 Northern Italy. *Anal. Bioanal. Chem.* 387, p.1469.

- 2176 Luo, Y., Guo, W., Ngo, H. H., Nghiem, L.D., Hai, F. Ibney., Zhang, J., Liang, S. 2014. A  
2177 review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and  
2178 removal during wastewater treatment. *Science of the Total Environment*, 473-474  
2179 (March), 619-641.
- 2180 Maron, D.M., Ames, B.N. 1983. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test.  
2181 *Mutat. Res.* 11,173-215.
- 2182 Meier, J.R., Lingg, R.D., Bull, R.J. 1983. Formation of mutagens following chlorination of  
2183 humic acid. A model for mutagen formation during drinking water treatment, *Mutat. Res.*  
2184 118, 25-41.
- 2185 Meier, J.R. 1988. Genotoxic activity of organic chemicals in drinking water. *Mutat Res.* 196,  
2186 211–45.
- 2187 Montagner, C.C., Jardim, W.F. 2011. Spatial and seasonal variations of pharmaceuticals and  
2188 endocrine disruptors in the Atibaia River, São Paulo State (Brazil). *J. Braz. Chem. Soc.*  
2189 22, p 1452.
- 2190 Musolff, A., Leschik, S., Moöder, M., Strauch, G, Reinstorf, F., Schirmer, M. 2009. Temporal  
2191 and spatial patterns of micropollutants in urban receiving waters. *Environ. Pollut.* 157,  
2192 p.3069.
- 2193 Nawrocki, J., Andrzejewski, P., 2011. Nitrosamines and water. *J. Hazard Mater.* 189, 1-18.
- 2194 Nihemaiti, M., Le Roux, J., Hoppe-Jones, C., Reckhow, D.A., Croué, J.P. 2017. Formation of  
2195 haloacetonitriles, haloacetamides, and nitrogenous heterocyclic byproducts by  
2196 chloramination of phenolic compounds, *Environ. Sci. Technol.* 51, 655–663,  
2197 <http://dx.doi.org/10.1021/acs.est.6b04819>.
- 2198 Ohe, T., Watanabe, T., Wakabayashi, K. 2004. Mutagens in surface waters: a review.  
2199 *Mutation Research.* 567, 109-149.
- 2200 Ohe, T., White, P.A., DeMarini, D.M. 2003. Mutagenic characteristics of river waters flowing  
2201 through large metropolitan areas in North America. *Mutat. Res.* 534, 101–112.
- 2202 Park, J.H., Lee, B.J., Lee, S.K., Kim, K., Lee, K.H., Che, J.H., Kang, K.S., Lee, Y.S. 2000.  
2203 Genotoxicity of drinking water from three Korea cities. *Mutation research.* 466, 173-178.
- 2204 Pereira, T.S., Rocha, J.A.V., Duccatti, A., Silveria, G.A., Pastoriza, T.F., Bringuenti, L.,  
2205 Vargas, V.M.F. 2007. Evaluation of mutagenic activity in supply water at three sites in  
2206 the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Mutat. Res.* 629,71-80.
- 2207 Pohren, R.S., Rocha, J.A.V., Leal, K.A., Vargas, V.M.F. 2012. Soil mutagenicity as a strategy  
2208 to evaluate environmental and health risks in a contaminated area. *Environ.* 44, 40–52.
- 2209 Quintana, J., Martí, I., Ventura, F. 2001. Monitoring of pesticides in drinking and related  
2210 waters in NE Spain with a multiresidue SPE-GC–MS method including an estimation of  
2211 the uncertainty of the analytical results. *J. Chromatogr. A.* 938, p 3.
- 2212 Raimundo, C. C. M. 2011. Contaminantes emergentes em água tratada e seus mananciais:  
2213 sazonalidade, remoção e atividade estrogênica. 204 f. Tese de Doutorado (Química  
2214 ambiental) - Instituto de Química, Departamento de Química Analítica, Laboratório de  
2215 Química Ambiental da Universidade Estadual de Campinas, Campinas – São Paulo.
- 2216 Rezemini, A.L., Vaz, J.M., Carvalho, L.R.E. 2008. Solid-phase microextraction for  
2217 determination of 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2[5H]-furanona in water.  
2218 *Journal of the Brazilian Chemical Society.* 19, 922-928.
- 2219 Richardson, S.D. 1998. Drinking water disinfection by-products. *The Encyclopedia of*  
2220 *Environmental Analysis and Remediation*, 3. John Wiley & Sons I. 1398–421.
- 2221 Richardson, S.D.; Plewa, M.J.; Wagner, E.D.; Schoeny, R.; Demarini, D.M. 2007.  
2222 Occurrence, genotoxicity, and carcinogenicity of regulated and emerging disinfection by  
2223 products in drinking water: a review and roadmap for research. *Mutat.Res.* 636, 178–242.

- 2224 Satinder, A. 2009. Handbook of water purity and quality. London: Acadeimi.
- 2225 Stackelberg, P.E., Gibs, G., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Zaugg, S.D., Lippincott, R.L. 2007
- 2226 Efficiency of conventional drinking-water-treatment processes in removal of
- 2227 pharmaceuticals and other organic compounds. *Sci. Total Environ.* 377, p 255.
- 2228 Stamatis, N.K., Konstantinou, I.K. 2013. Occurrence and removal of emerging
- 2229 pharmaceutical, personal care compounds and caffeine tracer in municipal sewage
- 2230 treatment plant in Western Greece. *J Environ Sci Heal B.* 48, 800-813.
- 2231 Tagliari, K.C., Cecchini, R., Rocha, J.A.V., Vargas, V.M.F. 2004. Mutagenicity of sediment
- 2232 and biomarkers of oxidative stress in fish from aquatic environments under the influence
- 2233 of tanneries. *Mutat. Res.* 561, 101–117.
- 2234 Ternes, T., Joss, A., Oehlmann, J. 2015. Occurrence, fate, removal and assessment of
- 2235 emerging contaminants in water in the water cycle (from wastewater to drinking water).
- 2236 *Water Research.* 72, p. 1-2.
- 2237 Togola, A., Budzinski, H. 2008. Multi-residue analysis of pharmaceutical compounds in
- 2238 aqueous samples. *J. Chromatogr. A.* 1177, p.150.
- 2239 Umbuzeiro, G.D.A., Roubicek, D.A., Sanchez, P.S., Sato, M.I. 2001. The Salmonella
- 2240 mutagenicity assay in a surface water quality monitoring program based on a 20-year
- 2241 survey. *Mutat. Res.* 491,119–126.
- 2242 USEPA - U.S. Environmental Agency. 2012. Integrated risk information system (IRIS) N-
- 2243 Nitrosodimethylamine.
- 2244 Vargas et al., (1993; Vargas, V.M.F., Motta, V.E.P., Henriques, J.A.P. 1993. Mutagenic
- 2245 activity detected by the Ames test in river water under the influence of petrochemical
- 2246 industries. *Mutat. Res.* 319, 31-45.
- 2247 Vargas, V.M.F.; Migliavacca, S.B.; Horn, R.C, Terra, N.R. 2008. Comparative temporal
- 2248 ecotoxicological study in a river basin influenced by petrochemical industries. *Science of*
- 2249 *the Total Environment.* 392,79-92.
- 2250 Verliefde, A., Cornelissen, E., Amy, G., Bruggen, B.V., Dijk, H. 2007. Priority organic
- 2251 micropollutants in water sources in Flanders and the Netherlands and assessment of
- 2252 removal possibilities with nanofiltration. *Environ. Pollut.* 146, p 281.
- 2253 Vettorello, G., Brandt, V., Dallazen, M.C., Kunh, D., Etgeton, H.P., Spellmeyer, J.G. ,
- 2254 Carlesso, W.M., Hoehne, L.. 2017. Micropoluentes em água – o novo desafio emergente.
- 2255 *Revista Caderno Pedagógico.* 14 (1), 72-83.
- 2256 Wagner, E.D., Hsu, K.M., Lagunas, A., Mitch, W.A., Plewa, M.J. 2012. Comparative
- 2257 genotoxicity of nitrosamine drinking water disinfection byproducts in Salmonella and
- 2258 mammalian cells. *Mutation Research.* 741, 109– 115.
- 2259 Wang, C., Shi, H., Adams, C.D., Gamagedara, S., Stayton, I., Timmons, T. 2011.
- 2260 Investigation of pharmaceuticals in Missouri natural and drinking water using high
- 2261 performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Water Res.*45,1818-
- 2262 1828.
- 2263 Wang, S., Tian, D., Zheng, W., Jiang, S., Wang, X., Andersen, M.E., Zheng, Y., He, G., Qu,
- 2264 W. 2013. Combined exposure to 3-chloro-4-dichloromethyl-5-hydroxy-2(5H)-furanone
- 2265 and microsytin-LR increases genotoxicity in Chinese hamster ovary cells through
- 2266 oxidative stress, *Environ. Sci. Technol.* 47, 1678–1687, [http://dx.](http://dx.doi.org/10.1021/es304541a)
- 2267 [doi.org/10.1021/es304541a](http://dx.doi.org/10.1021/es304541a).
- 2268 Warren, SH; Claxton, LD; Diliberto, J., Hughes, TJ; Swank, A, Usnierz, DH, Marshall, V,
- 2269 Demarini, DM. 2015. Survey of the mutagenicity of surface water, sediments, and
- 2270 drinking water from the Penobscot Indian Nation. *Chemosphere*, v. 120, n. 2015, p. 690–
- 2271 696.

2272 Watanabe, T., Takahashi, Y., Takahashi, T., Nukaya, H., Terao, Y., Hirayama, T.,  
2273 Wakabayashi, K., 2002. Seasonal fluctuation of the mutagenicity of river water in Fukui,  
2274 Japan, and the contribution of 2-phenylbenzotriazole-type mutagens. *Mutat. Res.* 519,  
2275 187–197.

2276 Yamada, M., Matsui, K., Sofuni, T., Nohmi, T. 1997. New tester strains of *Salmonella*  
2277 typhimurium lacking O6-methylguanine DNA methyltransferases and highly sensitive to  
2278 mutagenic alkylating agents, *Mutat. Res.* 381, 15–24.

2279

2280

2281

2282

2283

2284

2285

2286

2287

2288

2289

2290

2291

2292

2293

2294

2295

2296

2297

2298

2299

## 2300 **5. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

2301  
2302 A degradação dos mananciais hídricos tem sido gerada pelas ações indevidas do Homem,  
2303 resultando em prejuízos não apenas para o ecossistema, mas também para a saúde da  
2304 população humana. Os impactos são principalmente através do consumo de recursos naturais  
2305 em ritmo mais acelerado do que a capacidade de serem renovados e pela geração de produtos  
2306 residuais em quantidades maiores do que podem ser integradas ao ciclo natural de nutrientes.  
2307 Além disso, muitos desses resíduos apresentam propriedades tóxicas, genotóxicas,  
2308 mutagênicas e cancerígenas. O desenvolvimento urbano é uma das maiores causas da  
2309 degradação dos mananciais, pois o crescimento populacional acaba gerando  
2310 impermeabilização do solo, remoção florestal, aumento de lançamento direto de lixo e esgoto  
2311 e a localização de aterros sanitários próximas de mananciais. Neste contexto, o principal  
2312 desafio é a gestão sustentável do suprimento e da demanda de água para que as atuais  
2313 gerações supram as suas necessidades sem comprometer a possibilidade de que as futuras  
2314 gerações também o façam.

2315 A área de estudo vem sendo avaliada nos últimos anos quanto à presença de agentes  
2316 perigosos relacionados à atividade de conservação de madeiras, em diversos compartimentos  
2317 ambientais: solo, água, sedimento e ar. Pesquisa recente verificou contaminação do  
2318 sedimento, em locais destinados à captação de água potável no Rio Taquari (RS), próximos a  
2319 essa área em processo de remediação de solo contaminado. Dando continuidade a este estudo,  
2320 o objetivo da tese foi analisar a presença de contaminantes em locais de captação de água  
2321 potável, definindo as fontes e os efeitos tóxicos e genotóxicos desses estressores como  
2322 parâmetros de qualidade para o ecossistema, sua influência na água tratada e possíveis  
2323 reflexos para a saúde humana.

2324 A escolha dos locais de estudo no rio permitiu verificar a contribuição de fontes  
2325 específicas de contaminação para cada área, sendo atividades relacionadas à agricultura  
2326 predominantes, principalmente nos locais mais a jusante do estudo. No local Ta063 (à  
2327 montante), além da agricultura foram encontradas, próximas à bomba de captação de água,  
2328 áreas com atividades industriais de alto a médio potencial poluidor. Estas informações foram  
2329 obtidas através das ferramentas SIGs onde dados das sub-bacias foram combinados com um  
2330 mapa de uso e cobertura do solo. A classificação do potencial poluidor foi importante para o  
2331 trabalho, pois auxiliou no conhecimento do tipo de fonte que poderia estar afetando as regiões  
2332 de estudo. Esta parte da pesquisa foi realizada através do levantamento das atividades  
2333 licenciadas e cadastradas na FEPAM, órgão ambiental responsável pela fiscalização do  
2334 funcionamento dos empreendimentos no estado. Além disso, pesquisa sobre o tipo de  
2335 tratamento de esgoto realizado nas áreas investigadas mostrou que estas não apresentam  
2336 tratamento e destino de esgoto adequado, resultando em mais uma importante fonte de  
2337 contaminação para o Rio Taquari.

2338 Os resultados do ensaio *Salmonella*/microsoma nas amostras de extratos orgânicos de  
2339 sedimento e água coletadas no rio, durante a primeira fase do estudo, mostraram a prevalência  
2340 de mutagênicos de ação direta nas áreas de captação de água potável investigadas. O local  
2341 Ta032 sinalizou a maior potência mutagênica em amostras de sedimento, enquanto o Ta063  
2342 nas amostras de água. O local Ta011 apresentou respostas significativas tanto em amostras de  
2343 sedimento quanto água. Em Ta006 foi detectada a menor potência de mutagênese entre os  
2344 locais estudados indicando uma provável consequência da retirada das principais fontes ativas  
2345 da área de solo contaminado, localizada a 4 km a jusante. Ensaio com *A. cepa* em amostras  
2346 *in natura* de sedimentos, visando identificar respostas citogenéticas, mostraram concordância  
2347 com os resultados para mutagênese molecular observados no teste *Salmonella*/microsoma,



2348 indicando o local Ta032 como o de maior presença de compostos genotóxicos. Ainda, foi  
2349 realizado o ensaio FET em *D. rerio* em amostras de água superficial *in natura* dos quatro  
2350 locais de estudo, não indicando toxicidade aguda e crônica nas condições investigadas,  
2351 enquanto nos ensaios *Salmonella*/microsoma foram utilizados extratos obtidos a partir de  
2352 grandes volumes de água.

2353         As análises químicas realizadas para dosagens de HPAs e metais pesados nos  
2354 sedimentos dos quatro locais de amostragem, mostraram pequena contribuição destes grupos  
2355 de compostos para explicar os danos detectados nos ensaios de genotoxicidade. No entanto,  
2356 os resultados de potência mutagênica quando comparados com a literatura internacional  
2357 permitem classificar como moderadamente mutagênica para água, a amostra de Ta063, e  
2358 altamente contaminada para sedimento a Ta032. Assim, estes resultados indicaram a presença  
2359 de uma mistura de contaminantes biologicamente ativos que induziram valores significativos  
2360 importantes de atividade mutagênica.

2361         Na segunda etapa deste trabalho foi investigada a presença de contaminantes na água  
2362 distribuída à população. Amostragens antes e após o tratamento foram realizadas diretamente  
2363 nas estações de tratamento, correspondentes aos locais de captação no rio. Nestas amostras de  
2364 água foram realizadas análises de avaliação mutagênica e dosagens de compostos emergentes.  
2365 Os resultados indicaram uma redução do potencial mutagênico nas amostras de água bruta  
2366 comparadas com as analisadas na primeira etapa deste estudo, sendo significativo apenas no  
2367 local WTP03. Esta redução pode estar relacionada com um menor aporte de contaminantes  
2368 mutagênicos nestes locais ou, ainda, com fatores inerentes à dinâmica do meio aquático  
2369 influenciados por períodos diferentes de pluviosidade com aumento de lixiviação de  
2370 contaminantes de solo.

2371           Ao contrário das amostras de água bruta, a tratada apresentou atividade mutagênica  
2372 em todos os locais investigados. A estação de tratamento WTP04 foi a que mostrou valores  
2373 mais elevados, corroborando com dados de amostragem realizada anteriormente sinalizando  
2374 que compostos mutagênicos já estavam presentes desde 2015. Este local já possui um  
2375 histórico de contaminação no sedimento, sendo as principais fontes de contaminação  
2376 relacionadas à agricultura, sítio com solo contaminado e destino de esgoto inadequado. A  
2377 literatura estabelece que o aumento da potência mutagênica da água tratada por cloração em  
2378 relação à bruta é esperado através de resultados já conhecidos e descritos. Porém, devido ao  
2379 crescente lançamento de novos produtos de uso pessoal, industrial, farmacológico e  
2380 pesticidas, as respostas obtidas podem ter sofrido alteração de padrão. Neste sentido, nossos  
2381 resultados sugerem tanto os padrões esperados quanto outros não relatados na literatura. As  
2382 análises de MEs mostraram que, embora seja detectada redução das concentrações dos  
2383 compostos nas águas tratadas em relação às brutas, estes ainda estiveram presentes após  
2384 tratamento. Além disso, a análise dos resultados mostra que a maioria dos MEs, com exceção  
2385 da atrazina, não contribuíram na mutagênese detectada pelo ensaio *Salmonella*, uma vez que  
2386 as amostras brutas foram quase todas negativas. Entretanto, após tratamento, a mutagênese foi  
2387 encontrada em todas as ETAS, sugerindo que os MEs poderiam estar reagindo com o cloro e  
2388 formando DBPs mutagênicos com padrão diferente do esperado.

2389           Recentes estudos afirmam que muitas substâncias, como os MEs, não são  
2390 efetivamente removidas por tratamentos convencionais. Neste contexto, são necessários  
2391 tratamentos mais eficazes e específicos para evitar problemas de saúde humana e garantir  
2392 sustentabilidade ambiental. A cafeína (marcador químico de qualidade ambiental) encontrada  
2393 em todas as amostras indicou o comprometimento destas regiões relacionado à falta de  
2394 tratamento e destino adequado de esgoto. Como perspectivas futuras desta pesquisa e visando

2395 a qualidade dos mananciais hídricos são recomendados aos órgãos responsáveis pela  
2396 preservação ambiental, saneamento e saúde: (1) monitoramento contínuo para manter  
2397 equilíbrio dos ecossistemas aquáticos com preservação de suas funções, manutenção da vida  
2398 aquática e da qualidade dos usos nobres como as áreas destinadas à captação de água potável;  
2399 (2) priorizar a implementação de estações de tratamento de esgoto (ETE) adequadas para  
2400 controle da liberação de resíduos domésticos; (3) estabelecimento de normas para liberação  
2401 de novos produtos e métodos de tratamento de água menos reativos do que a cloração e mais  
2402 eficientes na degradação de substâncias orgânicas e inorgânicas. A literatura (Teodosiu et al.,  
2403 2018) aponta como avanços nesta área os processos com membranas específicas, adsorção em  
2404 carvão ativado e processos avançados de oxidação (Advanced oxidation processes - AOPs),  
2405 como métodos que têm apresentado eficiência para remoção de micropoluentes. No entanto,  
2406 estas tecnologias ainda estão em estudo e faltam dados para aplicação em larga escala.

2407 Este trabalho contou com a parceria da Vigilância de Saúde do Estado do Rio Grande do  
2408 Sul na qual tem acompanhado desde as amostragens das amostras até os resultados. A partir  
2409 destes resultados serão discutidas medidas saneadoras que busque garantir a qualidade do  
2410 ecossistema e seus reflexos no abastecimento público. Assim, a pesquisa científica está  
2411 evoluindo na busca de métodos alternativos sustentáveis para proteger os ecossistemas e a  
2412 população humana de efeitos adversos frente a esses novos desafios.

2413  
2414  
2415  
2416  
2417  
2418  
2419  
2420  
2421  
2422  
2423

2424

**6. REFERÊNCIAS DA TESE**

- 2425 Abdel-Shafy, H.I., Mansour, M.S.M. 2016 A review on polycyclic aromatic hydrocarbons:  
2426 Source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egyptian Journal*  
2427 *of Petroleum*. 25, 107–123.
- 2428 Appel, J.S.L., Terescova, V., Rodrigues, V.C.B., Varga, V.M.F. 2007. Aspectos toxicológicos  
2429 do preservativo de madeira CCA (arseniato de cobre cromato): revisão. *Rev. Bras.*  
2430 *Toxicol.* 19, 29 – 43
- 2431 Asakura, K., Satoh, H., Chiba, M., Okamoto, M., Serizawa, K., Nakano, M., Omae, K., 2009.  
2432 Genotoxicity studies of heavy metals: lead, bismuth, indium, silver and antimony. *J.*  
2433 *Occup. Health.* 51, 498–512.
- 2434 ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). 2008. Resumende Salud  
2435 Pública—Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos. Available. /[http://www.](http://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs69.pdf)  
2436 [atsdr.cdc.gov/es/phs/es\\_phs69.pdf](http://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs69.pdf).
- 2437 Barbazuk, W.B., Korf, I., Kadavi, C., Heyen, J., Tate, S., Wun, E., Johnson, S.L. 2000. The  
2438 syntenic relationship of the zebrafish and human genomes. *Genome research*. 10, 1351-  
2439 1358.
- 2440 Bayne, B.L., Brown, D.A., Burns, K., Dixon, D.R., Ivanovici, A., Livingstone, D.A., Lowe,  
2441 D.M., Moore, M.N., Stebbing, A.R.D., Widdings, J., 1985. *The Effects of Stress and*  
2442 *Pollution on Marine Animals*. Praeger, New York.
- 2443 Bedner, M., MacCrehan, W.A., 2006a. Reactions of the amine-containing drugs fluoxetine  
2444 and metoprolol during chlorination and dechlorination processes used in wastewater  
2445 treatment. *Chemosphere* 65, 2130–2137.
- 2446 Bedner, M., MacCrehan, W.A., 2006b. Transformation of acetaminophen by chlorination  
2447 produces the toxicants 1,4-benzoquinone and n-acetyl-pbenzoquinone imine. *Environ.*  
2448 *Sci. Technol.* 40, 516–522.
- 2449 Benotti, M.J., Trenholm, R.A., Van der Ford, B.J., Holady, J.C., Stanford, B.D., Snyder, S.A.  
2450 2009. Pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in U.S. drinking water.  
2451 *Environ. Sci. Technol.* 43, p 597.
- 2452 Bodzek, M., Dudziak, M. 2006. Elimination of steroidal sex hormones by conventional water  
2453 treatment and membrane processes. *Desalination*. 198., p 24.
- 2454 Bolong, N., Ismail, A.F., Salim, M.R., Matsura, T. 2009. A review of the effects of emerging  
2455 contaminants in wastewater and options for their removal. *Desalination*. 239, 229-246.
- 2456 Bonassi, S., Znaor, A., Ceppi, M., Lando, C., Chang, W.P., Nina Holland, N., Kirsch-Volders,  
2457 M., Zeiger, E., Ban, S., Barale, R., Bigatti, M.P., Bolognesi, C., Cebulka-Wasilewska,  
2458 A., Fabianova, E., Fucic, A., Hagmar, L., Joksic, G., Martelli, A., Migliore, L.,  
2459 Mirkova, E., Scarfi, M.R., Zijno, A., Norppa, H., Fenech, M., 2007. An increased  
2460 micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in  
2461 humans. *Carcinogenesis*. 28,(3), 625–631. doi:10.1093/carcin/bgl177.
- 2462 Brasil. 2005. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução CONAMA nº 357 de 17 de  
2463 março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais  
2464 para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento  
2465 de efluentes, e dá outras providências. Available. <http://www.mma.gov.br/conama>.
- 2466 Brasil 2006a. Ministério do Meio Ambiente (MMA). Água: Manual de uso. Alguns passos na  
2467 implementação do Plano Nacional de Recursos Hídricos. Ministério do Meio Ambiente,  
2468 Secretaria de Recursos Hídricos. Brasília. 109 p.
- 2469 Brasil. 2006b. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigilância e controle  
2470 da qualidade da água para consumo humano/Brasília. 212 p.

2471 Brasil, 2012. Conselho Nacional do Meio Ambiente - Resolução CONAMA nº 454 de 08 de  
2472 novembro de 2012, data em que entrou em vigor, revogou expressamente a Resolução  
2473 CONAMA nº 344 de 25 de março de 2004, que estabelecia diretrizes gerais e  
2474 procedimentos mínimos para a avaliação do material a ser dragado em águas  
2475 jurisdicionais brasileiras, e dá outras providências. Available.  
2476 <http://www2.mma.gov.br/port/conama>  
2477 Brasil. 2018. Agência Nacional de Águas (ANA). Conjuntura dos recursos hídricos no Brasil  
2478 2018: informe anual: versão atualizada, Brasília. 87 p.  
2479 Braunbeck, T., Bottcher, M., Hollert, H., Kosmehl, T., Lammer, E., Leist, E., Rudolf, M.,  
2480 Seitz, N. 2005. Towards an alternative for the acute fish LC50 test in chemical  
2481 assessment: the fish embryo toxicity test goes multi-species—an update. *Altex*, 22, 87–  
2482 102.  
2483 Briggs, J.P. 2002. The zebrafish: a new model organism for integrative physiology. *American*  
2484 *Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 282, R3-R9.  
2485 Cemeli, E., Wagner, E.D., Anderson, D., Richardson, S.D., Plewa, M.J. 2006. Modulation  
2486 of the cytotoxicity and genotoxicity of the drinking water disinfection byproduct  
2487 iodoacetic acid by suppressors of oxidative stress, *Environ. Sci. Technol.* 40, 1878–1883.  
2488 Chen, G., White, P.A. 2004. The mutagenic hazards of aquatic sediments: a review. *Mutat.*  
2489 *Res.* 567, 151-225.  
2490 Claxton, L.D., Matthews, P.P., Warren, S.H., 2004. The genotoxicity of ambient outdoor air,  
2491 a review: Salmonella mutagenicity. *Mutat. Res.* 567, 347-399.  
2492 Claxton, L.D. & Woodall Jr., G.M., 2007. A review of the mutagenicity and rodent  
2493 carcinogenicity of ambient air. *Mutat. Res.* 636, 36-94.  
2494 Claxton, L.D., Umbuzeiro, G.A., DeMarini, D., 2010. The Salmonella mutagenicity assay: the  
2495 stethoscope of genetic toxicology for the 21st century. *Environ. Health Perspect.* 118  
2496 (11), 1515-1522.  
2497 Coronas, M.V., Bavaresco, J., Rocha, J.A.V., Gelle, A.M., Caramão, E.B., Rodrigues,  
2498 M.L.K., Vargas, V.M.F. 2013. Attic dust assessment near a wood treatment plant: Past air  
2499 pollution and potential exposure. *Ecotox. and Environ.* 95, 153–160.  
2500 Cortés, C, Marcos, R. 2018. Genotoxicity of disinfection byproducts and disinfected waters:  
2501 A review of recent literature. *Mutat Res Gen Tox En.* 831, 1–12.  
2502 Costa, T.C., Brito, K.C.T., Rocha, J.A.V., Leal, K. A., Rodrigues, M.L.K., Minella, J.P.G.,  
2503 Matsumoto, S.T., Vargas, V.M.F. 2012. Run off of genotoxic compounds in river basin  
2504 sediment under the influence of contaminated soils. *Ecotox. Environ.* 75, 63–72.  
2505 Costa, T.C., Brito, K.C.T., Rocha, J.A.V., Leal, K. A., Rodrigues, M.L.K., Minella, J.P.G.,  
2506 Matsumoto, S.T., Vargas, V.M.F. 2017. Corrigendum to: Runoff of genotoxic  
2507 compounds in river basin sediment under the influence of contaminated soils [*Ecotoxicol.*  
2508 *Environ. Saf.* 75 (2012) 63–72]. *Ecotox. Environ.* 143, 351–352.  
2509 Dammski, A.P., Muller, B.R., Gaya, C., Regonato, D. 2011. Zebrafish-Manual de criação em  
2510 Biotério. Curitiba (PR): Universidade Federal do Paraná, 20-1.  
2511 Dolédec, S., Stutzner, B., 2008. Invertebrate traits for the biomonitoring of large European  
2512 rivers: an assessment of specific types of human impact. *Freshw. Biol.* 53,617–634.  
2513 Durigon, M. 2013. Qualidade da água e comunidades de diatomáceas epilíticas na bacia  
2514 hidrográfica do rio vacacaí, Santa Maria, Rio Grande do Sul, 82 f. Dissertação  
2515 apresentada ao curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia,  
2516 Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.  
2517 Esteves, F. A. Fundamentos de Limnologia. Rio de Janeiro: Interciência/FINEP, 1988. 575p.

- 2518 Fawell, J., Ong, C.N., 2012. Emerging contaminants and the implications for drinking water.  
2519 Int. J. Water Resour. Dev. 28, 247-263. <https://doi.org/10.1080/07900627.2012.672394>.
- 2520 Fenech, M., Bonassi, S., 2011. The effect of age, gender, diet and lifestyle on DNA damage  
2521 measured using micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes.  
2522 Mutagenesis 26, 43–49.
- 2523 Fent, K., Weston, A.A., Carminada, D. 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals.  
2524 Aquat Toxicol. 76, 122-59.
- 2525 Fiskesjo, G. 1985. The Allium test as standard in environmental monitoring. Hereditas. 102,  
2526 p. 99-112.
- 2527 Focazio, M.J., Kolpin, D.W., Barnes, K.K., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Zaugg, S.D., Barber,  
2528 L.B., Thurman, M.E. 2008. A national reconnaissance for pharmaceuticals and other  
2529 organic wastewater contaminants in the United States - II) Untreated drinking water  
2530 sources. Sci. Total Environ. 402, p201.
- 2531 Förstner, U., Wittman, G.T.W. 1981. Metal pollution in the aquatic environment. 2.ed. Berlin:  
2532 Springer-verlag. 486p
- 2533 Gameiro, P.H., Pereira, N.C., Rocha, J.A.V., Leal, K.A., Varga, V.M.F. 2018a. Assessment of  
2534 Sediment Mutagenicity in Areas under the Influence of a Contaminated Site Undergoing  
2535 a Remediation Process. Environ. Mol. Mutagen. 59, 625-638.
- 2536 Grellier, J., Rushton, L., Briggs, D.J., Nieuwenhuijsen, M.J. 2015. Assessing the human  
2537 health impacts of exposure to disinfection by-products – a critical review of concepts and  
2538 methods, Environ. Int. 78, 61–81, <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2015.02.003>.
- 2539 Grunwald, D.J., Eisen, J.S. Headwaters of the zebrafish--emergence of a new model  
2540 vertebrate. Nature reviews. Genetics. 3, p.717.
- 2541 Guillén, D, Ginebreda, A, Farré, M, Darbra, RM, Petrovic, M, Gros, M, Barceló, D. 2012.  
2542 Prioritization of chemicals in the aquatic environment based on riskassessment:  
2543 analytical, modeling and regulatory perspective. Sci. Total Environ.440, 236-252.
- 2544 Hagiwara, Y., Watanabe, M., Oda, Y., Sofuni, T., Nohmi, T. 1993. Specificity and sensitivity  
2545 of Salmonella typhimurium YG1041 and YG1042 strains possessing elevated levels of  
2546 both nitroreductase and acetyltransferase activity. Mutat. Res. 291,171–180.
- 2547 Holland, N., Bolognesi, C., Kirsch-Volders, M., Bonassi, S., Zeiger, E., Knasmueller, Z.,  
2548 Fenech, M., 2008. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for  
2549 biomonitoring DNA damage: The HUMN project perspective on current status and  
2550 knowledge gaps. Mutat.Res. 659, 93–108. doi:10.1016/j.mrrev.2008.03.007
- 2551 Hong, W.J., Jia, H., Li, W.F., Sun, Y., Liu, X., Wang, L. 2016. Polycyclic aromatic  
2552 hydrocarbons (PAHs) and alkylated PAHs in the coastal seawater, surface sediment and  
2553 oyster from Dalian, Northeast China. Ecotoxicology and Environmental Safety. 128,11–  
2554 20.
- 2555 Huszno, J., Klag, J. 2012. The reproductive cycle in the male gonads of Danio rerio  
2556 (Teleostei, Cyprinidae). Stereological analysis. Micron. 43, 666-672.
- 2557 IARC, 2010. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risks to Humans - Some  
2558 Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Related Exposures.  
2559 International Agency for Research on Cancer, 92, Lyon, France.
- 2560 IBAMA – Instituto Brasileiro do meio Ambiente e dos Recursos Renováveis. 2010. Produtos  
2561 agrotóxicos e afins comercializados em 2009 no Brasil – uma abordagem ambiental;  
2562 disponível em <http://www.ibama.gov.br>
- 2563 IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). 2019. Síntese de indicadores sociais  
2564 uma análise das condições de vida da população brasileira). Disponível:  
2565 <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv101629.pdf>

- 2566 Kado, N., Guirguis, G., Flessel, C., Chan, R., Chang, K., Wesolowski, J. 1986. Mutagenicity of  
 2567 fine (less than 2.5 microns) airborne particles: diurnal variation in community air  
 2568 determined by a Salmonella micro preincubation (microsuspension) procedure. *Environ.*  
 2569 *Mutagen.* 8, 53-66.
- 2570 Kari, G., Rodeck, U., Dicker, A.P. 2007. Zebrafish: an emerging model system for human  
 2571 disease and drug discovery. *Clinical Pharmacology and Therapeutics.* 82.
- 2572 Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., Schilling, T.F. 1995. Stages of  
 2573 Embryonic Development of the Zebrafish. *Developmental Dynamics,*203, 255-310.
- 2574 Legay, C., Rodriguez, M.J., Sérodes, J.B., Levallois, P; 2010. Estimation of chlorination by-  
 2575 products presence in drinking water in epidemiological studies on adverse reproductive  
 2576 outcomes: A review. *Science of the Total Environment.* 408, 456–472.
- 2577 Leme, D.M., Marin-Morales, M.A. 2009. Allium cepa test in environmental monitoring: A  
 2578 review on its application. *Mutat Res.* 682, 71–81.
- 2579 Lemos, C.T., Roedel, P.M., Terra, N.R., Oliveira, N.C.D., Erdtmann, B., 2007 River water  
 2580 genotoxicity evaluation using micronucleus assay in fish erythrocytes. *Ecotox. Environ.*  
 2581 *Safe.* 66, 391–401.
- 2582 Lemos, A.T., Lemos, C.T., Flores, A.N., Pantoja, E.O., Rocha, J.A.V., Vargas, V.M.F. 2016.  
 2583 Genotoxicity biomarkers for airborne particulate matter (PM2.5) in an area under  
 2584 petrochemical influence. *Chemosphere.* 159, 610-618.
- 2585 Levin, D.E., Yamasaki, E., Ames, B.N. 1982. A new Salmonella tester strain, TA97, for the  
 2586 detection of frameshift mutagens. A run of cytosines as a mutational hot-spot. *Mutat.*  
 2587 *Res.* 2, 315-30.
- 2588 Lieschke, J.G.; Currie, P.D. 2007. Animal models of human disease: Zebrafish swim into  
 2589 view. *Nature Reviews-Genetics.* 8, 353-67.
- 2590 Long, G.Q. 1997. GATA-1 expression pattern can be recapitulated in living transgenic  
 2591 zebrafish using GFP reporter gene. *Development.* 124, 4105-4111.
- 2592 Luo, Y., Guo, W., Ngo, H. H., Nghiem, L.D., Hai, F. Ibney., Zhang, J., Liang, S. 2014. A  
 2593 review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and  
 2594 removal during wastewater treatment. *Science of the Total Environment,* 473-474  
 2595 (March), 619-641.
- 2596 Ma, T.H.; Xu, Z.; Xu, C.; McConnell, H.; Rabago, E.V.; Arreola, G.A. & Zhang, H. 1995. The  
 2597 improved Allium/Vicia root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental  
 2598 pollutants. *Mutation Research.* 334, 185-195.
- 2599 Marvin, C.H., McCarry, B.E., Villella, J., Allan, L.M., Bryant, D.W. 2000. Chemical and  
 2600 biological profiles of sediments as indicators of sources of contamination in Hamilton  
 2601 Harbour. Part II. Bioassay directed fractionation using the Ames Salmonella/microsome  
 2602 assay. *Chemosphere.* 41, 989–999.
- 2603 Maron, D.M., Ames, B.N. 1983. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test.  
 2604 *Mutat. Res.* 11,173-215.
- 2605 Meybeck, M., Helmer, R. 1992. An introduction to water quality. In. CHAPMAN, D. 1996.  
 2606 *Water quality assessment.* 2 ed. Cambridge. University Press. 651p.
- 2607 Moraes, L.R.S., Borja, P.C., Tosta, C.S. Qualidade da água da rede de distribuição e de beber  
 2608 em assentamento periurbano: estudo de caso. In: Congresso Brasileiro de Engenharia  
 2609 sanitária e ambiental, 20., 1999, Rio de Janeiro. Anais... Rio de Janeiro: Abes, 1999.
- 2610 Mortelmans, K., Zeiger, E. 2000. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay.  
 2611 *Mutat. Res.* 455,29–60.
- 2612 Nagel, R. 2002. DarT: The embryo test with the zebrafish Danio rerio a general model in  
 2613 ecotoxicology and toxicology. *Altex,* 19, 38–48.

- 2614 Nam, S.; Choi, D.; Kim, S.; Her, N.; Zoh, K. 2014. Adsorption characteristics of selected  
2615 hydrophilic and hydrophobic micropollutants in water using activated carbon. *Journal of*  
2616 *Hazardous Materials*. 270, 144–152. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/j.](http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.01.037)  
2617 [jhazmat.2014.01.037](http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.01.037)>.
- 2618 Nieuwenhuijsen, M.J., Dadvand, P., Grellier, J. Martinez, D., Vrijheid, M. 2013.  
2619 Environmental risk factors of pregnancy outcomes: a summary of recent meta analyses of  
2620 epidemiological studies. *Environ. Health*. 12 (6), 1-10.
- 2621 OECD (Organization for Economic Co-Operation and Development). 2013. Guideline for  
2622 Testing of Chemicals. Fish Embryo Toxicity (FET) Test (236).
- 2623 Ohe, T., Watanabe, T., Wakabayashi, K. 2004. Mutagens in surface waters: a review.  
2624 *Mutation Research*. 567, 109-149.
- 2625 Pagano, A. D., Zeiger, E. 1992. Conditions for detecting the mutagenicity of divalent metals  
2626 in *Salmonella typhimurium*. *Environ. Mol. Mutag.* 19, 139-146. Hagiwara et al, 1983.
- 2627 Pereira Netto, A.D., Moreira, J.C., Dias, A.E.X.O., Arbilla, G., Ferreira, L.F.V., Oliveira,  
2628 A.S., Barek, J., 2000. Evaluation of human contamination with polycyclic aromatic  
2629 hydrocarbons (PAHs) and their nitrated derivatives (NPAHs): a review of methodology.  
2630 *Quim. Nova*. 23(6), 765-773.
- 2631 Pereira, T.S., Rocha, J.A.V., Duccatti, A., Silveria, G.A., Pastoriza, T.F., Bringuenti, L.,  
2632 Vargas, V.M.F. 2007. Evaluation of mutagenic activity in supply water at three sites in  
2633 the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Mutat. Res.* 629, 71-80.
- 2634 Plewa, M.J., Wagner, E.D., Muellner, M.G., Hsu, K.M., Richardson, S.D. 2008. Comparative  
2635 mammalian cell toxicity of N-DBPs and C-DBPs. In *Disinfection By-Products in*  
2636 *Drinking Water: Occurrence, Formation, Health Effects, and Control*; Karanfil, T.,  
2637 Krasner, S. W., Westerhoff, P., Xie, Y., Eds.; American Chemical Society: Washington,  
2638 D.C. 36–50.
- 2639 Plewa, M.J., Wagner, E.D. 2011. Drinking water disinfection by-products: comparative  
2640 mammalian cell cytotoxicity and genotoxicity, in: J.O. Nriagu (Ed.), *Encyclopedia of*  
2641 *Environmental Health*, Elsevier, Burlington. 2011, 806–812.
- 2642 Pohren, R.S., Rocha, J.A.V., Leal, K.A., Vargas, V.M.F. 2012. Soil mutagenicity as a strategy  
2643 to evaluate environmental and health risks in a contaminated area. *Environ.* 44, 40–52.
- 2644 Postigo, C., Richardson, S.D. 2014. Transformation of pharmaceuticals during oxidation/  
2645 disinfection processes in drinking water treatment, *J. Hazard. Mater.* 279, 461–475.  
2646 <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.07.029>.
- 2647 Pruden, A., Pei, R., Storteboom, H., Carlson, K.H. 2006. Antibiotic resistance genes as  
2648 emerging contaminants: Studies in Northern Colorado. *Environ Sci Technol.* 40, 7445-  
2649 50.
- 2650 Quintana, J., Martí, I., Ventura, F. 2001. Monitoring of pesticides in drinking and related  
2651 waters in NE Spain with a multiresidue SPE-GC–MS method including an estimation of  
2652 the uncertainty of the analytical results. *J. Chromatogr. A*. 938, p 3.
- 2653 Raimundo, C. C. M. 2011. Contaminantes emergentes em água tratada e seus mananciais:  
2654 sazonalidade, remoção e atividade estrogênica. 204 f. Tese de Doutorado (Química  
2655 ambiental) - Instituto de Química, Departamento de Química Analítica, Laboratório de  
2656 Química Ambiental da Universidade Estadual de Campinas, Campinas – São Paulo.
- 2657 Rand, G.M., Petrocelli, S.R., 1985. *Fundamentals of aquatic toxicology – methods and*  
2658 *applications*. Hemisphere Publishing Corporation, Washington. 659p.
- 2659 Richardson, S.D.; Plewa, M.J.; Wagner, E.D.; Schoeny, R.; Demarini, D.M. 2007.  
2660 Occurrence, genotoxicity, and carcinogenicity of regulated and emerging disinfection by  
2661 products in drinking water: a review and roadmap for research. *Mutat. Res.*, 636, 178–242.



2662 Rivera-Utrilla, J., Sanchez-Polo, M., Ferro-Garcia, Prados-Joya, G., Ocampo-Perez, R., 2013.  
2663 Pharmaceuticals as emerging contaminants and their removal from water. A review.  
2664 Chemosphere 93, 1268-1287.

2665 RS, (Rio Grande do Sul). Secretaria Estadual do Meio Ambiente / Departamento de Recursos  
2666 Hídricos (SEMA/DRH)/Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luiz  
2667 Roessler – FEPAM/Comitê de Gerenciamento da Bacia Hidrográfica do Rio Taquari-  
2668 Antas. Plano de Bacia Hidrográfica do Rio Taquari – Antas. Relatório Síntese - Etapa A  
2669 e B . Elaborado por: STE – Serviços Técnicos de Engenharia. 2012.

2670 Schneneider, A.C.R., Santos, J.L., Porawski, M., Schaefer, P.G., Maurer, R.L., Matte, U.,  
2671 Silveira, T.R. 2009. Implementação de um novo modelo de experimentação animal –  
2672 zebrafish. Rev. HCPA. 29, 100-103.

2673 Stackelberg, P.E., Gibs, G., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Zaugg, S.D., Lippincott, R.L. 2007.  
2674 Efficiency of conventional drinking-water-treatment processes in removal of  
2675 pharmaceuticals and other organic compounds. Sci. Total Environ. 377, p 255.

2676 Stuelten, C.H., Parent, C.A., Montell, D.J. 2018. Cell motility in cancer invasion and  
2677 metastasis: Insights from simple model organisms. Nature Reviews Cancer.

2678 Tagliari, K.C., Cecchini, R., Rocha, J.A.V., Vargas, V.M.F. 2004. Mutagenicity of sediment  
2679 and biomarkers of oxidative stress in fish from aquatic environments under the influence  
2680 of tanneries. Mutat. Res. 561, 101–117.

2681 Teodosiu, C., Gilca, A.F., Barjoveanu, G., Fiore, S. 2018. Emerging pollutants removal  
2682 through advanced drinking water treatment: A review on processes and environmental  
2683 performances assessment . Journal of Cleaner Production. 197, 1210-1221.

2684 Tijani, JO, Fatoba, OO, Babajide, OO, Petrik, LF. 2016. Pharmaceuticals, endocrine  
2685 disruptors, personal care products, nanomaterials and perfluorinated pollutants: a review.  
2686 Environ Chem Lett. 14, 27–49.

2687 Tokiwa, H., Nakagawa, R., Horikawa, K., Ohkudo, A. 1987. The nature of the mutagenicity  
2688 and carcinogenicity of nitrated aromatic compounds in the environment. Environ Health  
2689 Perspect. 73,191– 199.

2690 Tundisi, J. G., Matsumura-Tundisi, T. 2008. Limnologia. Oficina de Textos, Brasil. WHO -  
2691 World Health Organization, 2013. Review of evidence on health aspects of air pollution.  
2692 Revijaap Project: Technical Report

2693 Umbuzeiro G.A., Roubicek, D.A., Rech, C.M., Sato, M.I.Z., Claxton, L.D. 2004.  
2694 Investigating the sources of the mutagenic activity found in a river using the Salmonella  
2695 assay and different water extraction procedures. Chemosphere. 54,1589–1597.

2696 USEPA (United States Environmental Protection Agency). 2017. Toxics Release Inventory  
2697 (TRI) 2017 National Analysis. Disponível:  
2698 [https://www.epa.gov/sites/production/files/2019-](https://www.epa.gov/sites/production/files/2019-03/documents/2017_tri_national_analysis_exec_summary_0.pdf)  
2699 [03/documents/2017\\_tri\\_national\\_analysis\\_exec\\_summary\\_0.pdf](https://www.epa.gov/sites/production/files/2019-03/documents/2017_tri_national_analysis_exec_summary_0.pdf)

2700 Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in  
2701 environmental risk assessment: a review. Environ Toxicol Phar. 13, 57-149.

2702 Vargas, V.M.F.; Migliavacca, S.B.; Horn, R.C, Terra, N.R. 2008. Comparative temporal  
2703 ecotoxicological study in a river basin influenced by petrochemical industries. Science of  
2704 the Total Environment. 392,79-92.

2705 Verliefde, A., Cornelissen, E., Amy, G., Bruggen, B.V., Dijk, H. 2007. Priority organic  
2706 micropollutants in water sources in Flanders and the Netherlands and assessment of  
2707 removal possibilities with nanofiltration. Environ. Pollut. 146, p 281.

2708 Vigano L, Arilloi A, Falugi C, Melodia F, Polesello S. 2001. Biomarkers of exposure and  
2709 effect in flounder (*Platichthys flesus*) exposed to sediments of the Adriatic Sea. *Mar*  
2710 *Pollut Bull.* 42,887–894.

2711 Wagner, E.D., Hsu, K.M.,Lagunas, A., Mitch, W.A., Plewa, M.J. 2012. Comparative  
2712 genotoxicity of nitrosamine drinking water disinfection byproducts in *Salmonella* and  
2713 mammalian cells. *Mutation Research.* 741, 109– 115.

2714 Wang, C., Shi, H., Adams, C.D., Gamagedara, S., Stayton, I., Timmons, T. 2011.  
2715 Investigation of pharmaceuticals in Missouri natural and drinking water using high  
2716 performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Water Res.*45,1818-  
2717 1828.

2718 Warren, SH; Claxton, LD; Diliberto, J., Hughes, TJ; Swank, A, Usnierz, DH, Marshall, V,  
2719 Demarini, DM. 2015. Survey of the mutagenicity of surface water, sediments, and  
2720 drinking water from the Penobscot Indian Nation. *Chemosphere*, v. 120, n. 2015, p. 690–  
2721 696.

2722 Westerhoff, P., Yoon, Y., Snyder, S., Wert, E., 2005. Fate of endocrine-disruptor,  
2723 pharmaceutical, and personal care product chemicals during simulated drinking water  
2724 treatment processes. *Environ. Sci. Technol.* 39, 6649-6663.

2725 Wetzel, R.G., 2001. *Limnology, Lake and river ecosystems.* Academic Press, San Diego,  
2726 USA.

2727 White, P.A., Claxton, L.D. 2004. Mutagens in contaminated soil: a review. *Mutat Res.* 567,  
2728 227-345.

2729 WHO - World Health Organization, 2013. Review of evidence on health aspects of air  
2730 pollution. REVIHAAP PROJECT: Technical Report

2731 WHO (World Health Organization). 2015. Progress on Sanitation and Drinking Water.  
2732 Update and MDG Assessment.

2733 Yamada, M., Matsui, K., Sofuni, T., Nohmi, T. 1997. New tester strains of *Salmonella*  
2734 typhimurium lacking O6-methylguanine DNA methyltransferases and highly sensitive to  
2735 mutagenic alkylating agents, *Mutat. Res.* 381, 15–24.

2736 Zeiger, E., 1998. Identification of rodent carcinogens and noncarcinogens using genetic  
2737 toxicity tests: premises, promises, and performance. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 28, 85–  
2738 95.

2739

2740