

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

ELAINE NOLASCO RIBEIRO

Avaliação da sensibilidade dos organismos utilizados em testes de toxicidade nos efluentes das indústrias de explosivos: seleção de uma bateria de testes na busca dos "organismos ideais"

Lorena – SP
2008

ELAINE NOLASCO RIBEIRO

Avaliação da sensibilidade dos organismos utilizados em testes de toxicidade nos efluentes das indústrias de explosivos: seleção de uma bateria de testes na busca dos "organismos ideais"

Tese apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia Industrial

Área de Concentração: Conversão de Biomassa
Orientadora: Profa. Dra. Teresa C. Brazil de Paiva
Co-orientador: Prof. Dr. Flávio Teixeira da Silva

Lorena – SP
2008

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catlogação na Publicação
Biblioteca Universitária
Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

Ribeiro, Elaine Nolasco

Avaliação da sensibilidade dos organismos utilizados em testes de toxicidade nos efluentes das indústrias de explosivos: seleção de uma bateria de testes na busca dos “organismos ideais” / Elaine Nolasco Ribeiro ; orientadora Teresa C. Brazil de Paiva, co-orientador Flávio Teixeira da Silva. -- 2008

165 f. : fig.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial. Área de Concentração: Conversão de Biomassa) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

1. Ecotoxicologia aquática 2. 2,4,6-Trinitrotolueno 3. Nitrocelulose 4. *Daphnia similis* 5. *Pseudokircheneriella subcaptata* 6. *Escherichia.coli* 7. *Pseudomonas putida*. I. Título.

628.351 - CDU

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho às pessoas mais queridas da minha vida: minha mãe, meu pai (*in memoriam*), minha irmã e ao meu marido, com muito amor e gratidão por todo apoio, incentivo e compreensão que tiveram para comigo, durante a minha vida e nos anos de realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me dado força e paciência para realizar este trabalho.

À Profa. Dra. Teresa C. Brazil de Paiva pela orientação e confiança.

Ao Prof. Dr. Flávio Teixeira da Silva pela co-orientação.

Ao Prof. Dr. Roy Eduard Bruns, do Dep. de Físico-Química do Instituto de Química da UNICAMP, pela ajuda na parte de estatística.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de doutorado.

À ANA/CEIVAP pelo suporte financeiro com recursos da cobrança pelo uso da água na bacia do Rio Paraíba do Sul.

À indústria de explosivos que forneceu os efluentes para realização deste trabalho.

Ao colega Lucrécio Fábio dos Santos pela sua colaboração ao longo deste trabalho e por facilitar o acesso aos efluentes.

À técnica Lúcia Aparecida C. B. de Castro (Lucinha), pela amizade, paciência, dedicação e por me ouvir em momentos difíceis. Muito Obrigada!

Ao Felipe e ao Birão pelo apoio técnico e pelas muitas águas de cultivo preparadas.

Às alunas de iniciação científica: Verônica, Telma, Letícia e Carol.

Ao colega Claudinei Fernandes pelas inúmeras discussões sobre o trabalho e a vida...

À todos os colegas e funcionários do DEBIQ.

À Carolina Marcondes, professora de inglês, pela revisão do abstract.

À Rita, João Marcos, Raquel e Júnior pela sua amizade e por me acolherem quando cheguei em Lorena.

Aos meus pais pela educação e suporte para que eu chegasse até aqui.

À minha irmã pelo incentivo para eu realizar este trabalho.

Ao meu querido marido pela paciência, companheirismo e compreensão durante estes anos de doutorado, e principalmente no final.

Que darei ao Senhor por todos os seus benefícios para comigo? Tomarei o cálice da salvação e invocarei o nome do Senhor (Sl 116:12-13).

Ribeiro, E. N.. **Avaliação da sensibilidade dos organismos utilizados em testes de toxicidade nos efluentes das indústrias de explosivos: seleção de uma bateria de testes na busca dos "organismos ideais"**. 2008. 165 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, 2008.

RESUMO

Durante a fabricação dos explosivos são utilizadas grandes quantidades de águas para remoção de contaminantes e produtos indesejáveis que acabam indo para estações de tratamento de efluentes ou corpos aquáticos. Os efluentes gerados contém ácidos, isômeros de explosivos, o próprio explosivo em suspensão, compostos que causam coloração nas águas, sólidos em suspensão e dependendo do explosivo em manufatura, elevados teores de nitrogênio e fósforo. Explosivos e seus derivados e aditivos apresentam efeitos tóxicos e deletérios ao meio ambiente que podem variar de muito intensos em alguns organismos a mínimo em outros. O presente trabalho teve por objetivo avaliar o potencial tóxico dos efluentes gerados em uma indústria de explosivos, localizada no Vale do Paraíba/SP, e comparar a sensibilidade dos organismos utilizados nos ensaios ecotoxicológicos. Foram avaliados os efluentes gerados na produção de nitrocelulose a partir do línter: deslignificação, branqueamento, nitração e mistura destes na proporção de 1:1, e os efluentes gerados na produção do 2,4,6-Trinitrotolueno: água amarela (AA), água vermelha (AV) e mistura da água amarela e água vermelha (A+V) na proporção de 77 e 23%, respectivamente – conforme vazão na indústria. Os organismos utilizados para os ensaios de toxicidade aguda foram: o microcrustáceo *Daphnia similis* (CE50 48 h), as bactérias *Escherichia coli* e *Pseudomonas putida* (CE50 6 h) e o peixe *Danio rerio* (CL50 48 h); para o ensaio de toxicidade crônica utilizou-se a alga *Pseudokirchneriella subcaptata* 96 h, CEO e CENO. Os resultados obtidos demonstraram toxicidade dos efluentes aos organismos-teste. Nos ensaios agudos com os efluentes da produção do TNT: (AA, AV e A+V), os valores de CE50 e CL50 foram inferiores a 2,0 % para todos os organismos-teste. Os ensaios agudos realizados com os efluentes da produção da nitrocelulose (deslignificação, branqueamento, nitração e mistura) demonstraram toxicidade, exceto pelo efluente da nitração que não inibiu as bactérias *E. coli* e *P. putida* até as concentrações de 80 e 87,3%, respectivamente. O efluente da mistura também não causou inibição do crescimento da *P. putida* até a concentração de 50%. O efluente do branqueamento causou imobilidade até as concentrações de 0,05% para *D. similis* e letalidade até 0,01% para *D. rerio*. Nos ensaios crônicos todos os efluentes foram tóxicos à alga *P. subcaptata* com valores de CENO inferior a 0,2% para os efluentes da produção de TNT e nitrocelulose (exceto o efluente da nitração, CENO 50%). De acordo com o teste estatístico utilizado para comparação da sensibilidade dos organismos por efluentes, *D. similis* foi o organismo-teste mais sensível para a maioria dos ensaios, seguido por *D. rerio* e *E. coli*. Os elevados valores encontrados de condutividade, sólidos dissolvidos e pH, podem ser a causa da toxicidade dos efluentes.

Palavras-chave: Ecotoxicologia aquática. 2,4,6-Trinitrotolueno. Nitrocelulose. *Daphnia similis*. *Pseudokirchneriella subcaptata*. *Escherichia.coli*. *Pseudomonas putida*. *Danio rerio*.

Ribeiro, E. N. **Assessment of the sensitivity of organisms used in toxicity tests with explosives industry wastewater: battery tests selection in the search of ideal organisms.** 2008. 165 f. Doctoral Thesis (Doctoral in Industrial Biotechnology) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, 2008.

ABSTRACT

During the manufacturing of explosives, great amounts of water are used for contamination and undesirable products removal that end up going to wastewater treatment facility or aquatic bodies. The generated effluents consists of, acids, explosive isomers, the explosive in suspension itself, composites that cause coloration in waters, suspended solids, depending on the explosive in manufacture, high levels of nitrogen and phosphor. Explosives and its derivatives present toxic and deleterious effect to the environment, that may vary from very intense in some organisms to minimum in others. The objective of the present study was to assess the toxic potential of effluents generated in an explosives industry located in Vale do Paraíba/SP, and to compare the organism sensitivity used for ecotoxicological assays. The effluents generated in nitrocellulose production, from cotton linters were evaluated: delignification, bleaching, nitration and mixture of these in 1:1 proportion, and the effluents generated in 2,4,6-Trinitrotoluene production: yellow water, red water and mixture of yellow and red water in 77 and 23% proportion, respectively – in accordance of industry outflow. The organisms used for acute toxicity assays were: the water flea *Daphnia similis* (EC50 48 h), *Escherichia coli* and *Pseudomonas putida* bacteria (EC50 6 h) and *Danio rerio* fish (LC50 48 h); for the chronic toxicity assay algae *Pseudokircheneriella subcaptata* (NOEC) and (OEC) were used. The obtained results showed effluents toxicity to test organisms. In the acute assays with effluents of TNT production (yellow water, red water and mixture of yellow and red water), the value of CE50 and LC50 were lower than 2,0% for all test-organisms. The acute assays with effluents of nitrocellulose production (delignification, bleaching, nitration and mixture) showed toxicity, except by nitration effluent that not inhibit the bacterias *E. coli* and *P. putida* up to the concentrations 80 and 87,3%, respectively. The bleaching effluent caused total immobility up to the concentrations of 0,05% for *D. similis* and 0,01% and *D. rerio*. For *E. coli* and *P. putida*, the EC50 was 36,6% and 73,11%, respectively. In the chronic toxicity assays, all effluents were toxic to the algae *P. subcaptata* with NOEC values lower than 0,2% for all effluents of TNT and nitrocellulose production (except to nitration effluent, NOEC 50%). In accordance with statistical test used for comparison of the sensitivity of the organisms for effluents, *D. similis* was the most sensible test organisms for the majority of effluents, followed by *D. rerio* and *E. coli*. In the whole, the bacteria were the less sensible test organisms. The elevated values found for conductivity, total dissolved solids and pH, can be can be on account of the toxicity of the efluentes.

Keywords: Aquatic Ecotoxicology. Explosives Effluents. *Daphnia similis*. *Pseudokircheneriella subcaptata*. *Escherichia.coli*. *Pseudomonas putida*.*Danio rerio*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Processo de produção do TNT em três estágios (USEPA, 1983).....	39
Figura 2 - A fórmula do 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) e seus metabólitos: 2-hidroxilamino-4,6-dinitrotolueno (2-NHOH-DNT), 4-hydroxylamino-2,6-dinitrotolueno (4-NHOH-DNT), 2-amino-4,6-dinitrotolueno (2-NH ₂ -DNT), 4-amino-2,6-dinitrotolueno (4-NH ₂ -DNT) e 2,4-diamino-6-nitrotolueno (2,4-(NH ₂) ₂ -NT) (SARLAUSKAS et al., 2004).....	41
Figura 3 - Fluxograma do processo da fabricação da nitrocelulose (SANTOS, 2006)...	48
Figura 4 - Processo de nitração da celulose (RODRIGUES, 2002).....	49
Figura 5 - Carta controle da sensibilidade da alga <i>P. subcaptata</i> ao ZNSO ₄ .7H ₂ O mg.L ⁻¹ , no período de outubro de 2005 a fevereiro de 2006 contendo média acumulada de valores e limites superior e inferior do intervalo de confiança.....	71
Figura 6 - Carta-controle da sensibilidade de <i>E. coli</i> ao CuSO ₄ .7H ₂ O mg.L ⁻¹ contendo média acumulada de valores e limites superior e inferior do intervalo de confiança, ensaios realizados de junho a outubro de 2006.....	72
Figura 7 - Carta-controle da sensibilidade de <i>P. putida</i> ao CuSO ₄ .7H ₂ O mg.L ⁻¹ , contendo média acumulada de valores e limites superior e inferior do intervalo de confiança, ensaios realizados de junho a outubro de 2006.....	73
Figura 8 - Carta-controle da sensibilidade de <i>D. similis</i> ao NaCl g.L ⁻¹ contendo média acumulada de valores, limites superior e inferior do intervalo de confiança.....	75
Figura 9 - Imobilidade (%) obtida nos ensaios de toxicidade aguda para <i>D. similis</i> com valores de CE50 48 h e respectivos intervalos de confiança para efluentes da produção de TNT: AA, AV e AA+AV, realizados nos meses de novembro a dezembro de 2006.....	80
Figura 10 - Imobilidade (%) obtida nos ensaios de toxicidade aguda para <i>D. similis</i> com valores de CE50 48 h e respectivos intervalos de confiança para efluentes da produção de nitrocelulose: designificação, branqueamento, nitração e mistura dos efluentes. Ensaios foram realizados no mês de dezembro de 2006.....	84
Figura 11 - Inibição (%) de crescimento de <i>E. coli</i> obtida nos ensaios de toxicidade aguda com valores de CE50 6 h e respectivos intervalos de confiança, para efluentes da produção de TNT: AA e AA+AV na proporção de 77 e 23 % respectivamente. Ensaios realizados no período de julho a agosto de 2006.....	90
Figura 12 - Inibição (%) de crescimento de <i>E. coli</i> obtido nos ensaios de toxicidade aguda com valores de CE50 6 h e respectivos intervalos de confiança para efluentes da nitração, branqueamento e mistura (designificação + branqueamento + nitração) na proporção de 1:1, ensaios realizados no período de julho a setembro de 2006.....	94
Figura 13 - Inibição (%) de crescimento de <i>P. putida</i> obtido nos ensaios de toxicidade aguda com valores de CE50 6 h e respectivos intervalos de confiança para efluentes da produção de TNT: AA e mistura da AA + AV na proporção de 77 e 23 % respectivamente. Ensaios realizados de julho a agosto de 2006.....	96
Figura 14 - Inibição (%) de crescimento de <i>P. putida</i> obtido nos ensaios de toxicidade aguda com valores de CE50 6 h e respectivos intervalos de confiança para efluentes do branqueamento, nitração e mistura (designificação + branqueamento + nitração) proporção de 1:1, ensaios realizados de agosto a setembro de 2006.....	98

Figura 15 - Letalidade (%) de <i>D. rerio</i> obtido nos ensaios de toxicidade aguda com valores de CL50 48 h e respectivos intervalos de confiança para efluentes da produção de TNT: AA, AV, AA+AV, ensaios realizados no período de abril a junho de 2007.....	103
Figura 16 - Letalidade (%) de <i>D. rerio</i> obtido nos ensaios de toxicidade aguda com valores de CL50 48 h e respectivos intervalos de confiança para efluentes da produção de nitrocelulose: deslignificação, branqueamento, nitração e mistura dos efluentes, ensaios realizados no período de abril a junho de 2007.....	103
Figura 17 – Inibição (%) do crescimento de <i>P. subcaptata</i> 96 h nos ensaios de toxicidade crônica com amostras dos efluentes da produção de TNT: AA, AV e AA+AV na proporção de 77 e 23 % respectivamente, realizados durante o mês de outubro de 2005.....	109
Figura 18 – Inibição (%) do crescimento de <i>P. subcaptata</i> 96 h nos ensaios de toxicidade crônica com amostras dos efluentes da produção de nitrocelulose: deslignificação, branqueamento, nitração e mistura realizados no período de outubro de 2005 a março de 2006.....	112

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados de toxicidade e carcinogenicidade do TNT e DNTs	41
Tabela 2 – Características dos efluentes da produção de nitrocelulose: deslignificação do algodão, branqueamento da polpa do algodão e nitração da celulose.....	50
Tabela 3 - Composição do meio L.C.Oligo (NBR 12648/05).....	59
Tabela 4 - Modo de preparo das soluções-teste com águas e efluentes utilizando o meio L.C.Oligo e amostra enriquecida (NBR 12648/05).....	59
Tabela 5 – Modo de preparo das soluções-teste com águas e efluentes para o ensaio com <i>D. similis</i> (NBR 12713/04).....	61
Tabela 6 - Modo de preparo das soluções-teste com águas e efluentes para o ensaio com <i>D. similis</i>	62
Tabela 7: Esquema da adição das soluções e diluições do experimento.....	65
Tabela 8: Síntese dos principais aspectos metodológicos utilizados nos ensaios de toxicidade	69
Tabela 9 – Dados mensais de concentração de inibição (CI) 96 h, intervalo de confiança (IC), desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV), obtidos na avaliação de sensibilidade da alga <i>P. subcaptata</i> , utilizando $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ mg.L ⁻¹ como substância de referência	71
Tabela 10 – Dados mensais de CE50 48 h, intervalo de confiança (IC), desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV), obtidos na avaliação de sensibilidade da bactéria <i>E. coli</i> , utilizando $CuSO_4 \cdot 7H_2O$ mg.L ⁻¹ como substância de referência.....	73
Tabela 11 – Dados mensais de CE50 48 h, intervalo de confiança (IC), desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV), obtidos na avaliação de sensibilidade da bactéria <i>P. putida</i> , utilizando $CuSO_4 \cdot 7H_2O$ mg.L ⁻¹ como substância de referência.....	74
Tabela 12 - Dados mensais de CE50 48 h, intervalo de confiança (IC), desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV), obtidos na avaliação de sensibilidade de <i>D. similis</i> , utilizando NaCl g.L ⁻¹ como substância de referência.....	75
Tabela 13 - Dados mensais de CL50 48 h, intervalo de confiança (IC), desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV), obtidos na avaliação de sensibilidade de <i>D. rerio</i> , utilizando KCl g.L ⁻¹ como substância de referência.....	76
Tabela 14 - Resumo das condições dos ensaios de sensibilidade com média acumulada e coeficiente de variação para cada organismo/substância de referência utilizadas	77
Tabela 15 - Resultado das análises físico-químicas dos efluentes da produção do 2,4,6-TNT e nitrocelulose, valores médios das várias amostras coletadas ao longo do estudo.....	77
Tabela 16 - Resultados da determinação dos parâmetros físico-químicos (pH, condutividade, dureza e OD inicial e final) realizados durante os ensaios de toxicidade aguda com <i>D. similis</i> para a AA.....	81
Tabela 17 - Resultados da determinação dos parâmetros físico-químicos (pH, condutividade, dureza e OD inicial e final) realizados durante os ensaios de toxicidade aguda com <i>D. similis</i> para a AV.....	81
Tabela 18 – Resultados da determinação dos parâmetros físico-químicos (pH, condutividade, dureza e OD inicial e final) realizados durante os ensaios de toxicidade aguda com <i>D. similis</i> para a AA + AV.....	81
Tabela 19 - Resultados da determinação dos parâmetros físico-químicos (pH, condutividade, dureza e OD inicial e final) realizados durante os ensaios de toxicidade aguda com <i>D. similis</i> para o efluente da deslignificação.....	85

Tabela 20 - Resultados da determinação dos parâmetros físico-químicos (pH, condutividade, dureza e OD inicial e final) realizados durante os ensaios de toxicidade aguda com <i>D. similis</i> para o efluente do branqueamento.....	85
Tabela 21 - Resultados da determinação dos parâmetros físico-químicos (pH, condutividade em mili Simens, dureza e OD inicial e final) realizados durante os ensaios de toxicidade aguda com <i>D. similis</i> para o efluente da nitração.....	85
Tabela 22 - Resultados da determinação dos parâmetros físico-químicos (pH, condutividade, dureza e OD inicial e final) realizados durante os ensaios de toxicidade aguda com <i>D. similis</i> para o efluente da mistura.....	86
Tabela 23- Resultados da determinação dos parâmetros físico-químicos (pH, condutividade, e OD inicial e final) realizados durante os ensaios de toxicidade aguda com <i>D. rerio</i> para o efluente da água amarela.....	100
Tabela 24 - Resultados da determinação dos parâmetros físico-químicos (pH, condutividade, e OD inicial e final) realizados durante os ensaios de toxicidade aguda com <i>D. rerio</i> para o efluente da água vermelha	101
Tabela 25 - Resultados da determinação dos parâmetros físico-químicos (pH, condutividade, e OD inicial e final) realizados durante os ensaios de toxicidade aguda com <i>D. rerio</i> para o efluente da mistura da água amarela com água vermelha.....	101
Tabela 26 - Resultados da determinação dos parâmetros físico-químicos (pH, condutividade, e OD inicial e final) realizados durante os ensaios de toxicidade aguda com <i>D. rerio</i> para o efluente da deslignificação.....	104
Tabela 27 - Resultados da determinação dos parâmetros físico-químicos (pH, condutividade, e OD inicial e final) realizados durante os ensaios de toxicidade aguda com <i>D. rerio</i> para o efluente do branqueamento.....	104
Tabela 28 - Resultados da determinação dos parâmetros físico-químicos (pH, condutividade em mili Simens, e OD inicial e final) realizados durante os ensaios de toxicidade aguda com <i>D. rerio</i> para o efluente da nitração.....	108
Tabela 29 - Resultados da determinação dos parâmetros físico-químicos (pH, condutividade, e OD inicial e final) realizados durante os ensaios de toxicidade aguda com <i>D. rerio</i> para o efluente da mistura.....	108
Tabela 30 - Dados comparativos de CE50 48 h para <i>D. similis</i> com pH neutralizado e pH original das amostras dos efluentes da produção de TNT (AA, AV, AA+AV) NC (deslignificação, branqueamento, nitração e mistura) ensaios realizados de junho a julho de 2007.....	118
Tabela 31: Resultados dos testes de toxicidade aguda com respectiva análise estatística dos efluentes da produção de TNT e nitrocelulose.....	123

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2,3DNT	2,3-Dinitrotolueno
2,4,6-TNT	2,4,6-Trinitrotolueno
2,4DANT	2,4-diamino-6-nitrotolueno
2,4DHA6NT	2,4-dihidroxilamino-6-nitrotolueno
2,4DNT	2,4-dinitrotolueno
2,4DNT	2,4-dinitrotolueno
2,6DANT	2,6-diamino-4-nitrotolueno
2,6DNT	2,6-dinitrotolueno
2,6DNT	2,6-dinitrotolueno
26DA4NT	2,6-diamino-4-nitrotolueno
2ADNT	2-amino-4,6 dinitrotolueno
2HA26DNT	2-hidroxilamino-2,6-dinitrotolueno
4ADNT	4-amino-2,6-dinitrotolueno
4-NQO	4-nitroquinolina1-óxido
AA	Água Amarela
AA + AV	Mistura da água amarela com água vermelha
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AOX	Compostos Orgânicos Adsorvíveis
ASTM	American Society for Testing and Materials
ATCC	American Type Culture Collection
AV	Água Vermelha
CE50	(Concentração Efetiva): concentração real da amostra que causa efeito agudo a 50% dos organismos no tempo de exposição, nas condições de ensaio
CEN	Comitê Europeu de Normalização
CENO	Concentração de Efeito Não Observado
CEO	Concentração de Efeito Observado
CETESB	Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo
CIp	Concentração de Inibição
CL50	(Concentração Letal): concentração real da amostra que causa efeito agudo a 50% dos organismos no tempo de exposição, nas condições de ensaio
CONAMA	Conselho Nacional de Meio ambiente
CV	Coefficiente de Variação
DAT	Diaminotolueno
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DDT	Dicloro-Difenil-Tricloroetano
DIN	Deutsches Institut für Normung
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNT	Dinitrotolueno
DQO	Demanda Química de Oxigênio
EEC	European Economic Community
HMX	1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocina-octaidro
ICP	The Inhibition Concentration Program
INPE	Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais
IPCC	Intergovernmental Panel on Climate Change
ISO	International Organization for Standardization
MNNG	N-metil-N'-nitrosoguanidina
MTBE	metil-ter-butyl-eter

NC	nitrocelulose
NIOSH	United States National Institute of Occupational Safety and Health
NNI	Nederlands Normalisatie-Instituut
NT	Nitrogênio Total
OD	Oxigênio Dissolvido
OECD	Organization for Economic Co-operation and Development
POPs	Poluentes Orgânicos Persistentes
RDX	hexahidro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazina
STD	Sólidos Totais Dissolvidos
USEPA	United States Environmental Protection Agency
USRCRA	Resource Conservation and Recovery Act
VC	Valor Crônico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 Bioensaios de Toxicidade: considerações gerais.....	17
2.2 Evolução dos bioensaios.....	19
2.3 Testes de toxicidade aguda e crônica.....	21
2.3.1 Organismos-teste e sua sensibilidade.....	24
2.3.2 Ensaios de toxicidade com produtores primários: algas.....	27
2.3.3 Ensaios de toxicidade com consumidores primários: microcrustáceos.....	29
2.3.3.1 <i>Daphnia</i>	30
2.3.3.2 <i>Ceriodaphnia</i>	31
2.3.4 Ensaios de toxicidade com consumidores secundários: peixes.....	32
2.3.5 Ensaios de toxicidade com decompositores: bactérias e fungos.....	33
2.4 Legislação	35
2.5 Efluentes das Indústrias de Explosivos.....	36
2.5.1 Produção de TNT e efluentes gerados.....	38
2.5.1.1 Toxicidade dos efluentes da produção de TNT.....	40
2.5.1.2 Fototoxicidade dos efluentes do TNT.....	44
2.5.1.3 Produção de nitrocelulose e efluentes gerados.....	46
2.5.1.4 Toxicidade dos efluentes da produção de nitrocelulose.....	50
2.6 Potencial mutagênico dos efluentes industriais.....	53
2.7 Justificativa.....	53
3. OBJETIVOS.....	56
3.1 Objetivo geral.....	56
3.2 Objetivos específicos.....	56
4.0 MATERIAIS E MÉTODOS.....	57
4.1 Área de estudo.....	57
4.1.1 Amostragem.....	57
4.2 Análises ecotoxicológicas.....	58
4.2.1 Ensaio de toxicidade crônica com a alga <i>Pseudokirchneriella subcaptata</i> (Korshikov) (antigamente <i>Selenastrum capricornutum</i>).....	58
4.2.1.1 Ensaio de sensibilidade com a alga <i>P. subcaptata</i>	60
4.2.2 Determinação da toxicidade aguda com o microcrustáceo <i>Daphnia similis</i> Straus, 1820 (Cladocera, Crustacea).....	60
4.2.2.1 Ensaio de sensibilidade com <i>Daphnia similis</i>	62
4.2.3 Teste de toxicidade aguda com o peixe <i>Danio rerio</i> – sistema estático.....	63
4.2.3.1 Teste de sensibilidade com <i>Danio rerio</i>	64
4.2.4 Teste de inibição de crescimento bacteriano com <i>Escherichia coli</i> e <i>Pseudomonas</i> <i>putida</i>	64
4.2.4.1 Teste de sensibilidade com a bactéria <i>E.coli</i>	65
4.2.4.2 Teste de sensibilidade com a bactéria <i>P. putida</i>	65
4.3 Análises físico-químicas.....	66
4.3.1 pH, condutividade, sólidos totais dissolvidos e oxigênio dissolvido.....	66
4.3.2 Cor.....	66
4.3.3 Demanda química de oxigênio (DQO).....	67
4.3.4 Dureza.....	67
4.4 Tratamento estatístico dos dados.....	68
4.5 Síntese dos aspectos metodológicos.....	69

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	70
5.1 Controle de qualidade dos organismos-teste	70
5.1.1 Teste de sensibilidade com <i>Pseudokirchneriella subcaptata</i>	70
5.1.2 Teste de sensibilidade com <i>E. coli</i> e <i>P. putida</i>	72
5.1.3 Teste de sensibilidade com <i>D. similis</i>	74
5.1.4 Teste de sensibilidade com <i>D. rerio</i>	75
5.1.5 Conclusão dos ensaios de sensibilidade	76
5.2 Parâmetros físico-químicos monitorados nos efluentes brutos	77
5.3 Testes de Toxicidade Aguda	79
5.3.1 <i>Daphnia similis</i>	79
5.3.1.1 Efluentes da produção do TNT	79
5.3.1.2 Efluentes da produção da Nitrocelulose	83
5.3.2.1 Efluentes da produção do TNT	90
5.3.2.2 Efluentes da produção da Nitrocelulose	93
5.3.3 <i>Pseudomonas putida</i>	95
5.3.3.1 Efluentes da produção do TNT	95
5.3.3.2 Efluentes da produção da Nitrocelulose	97
5.3.4 <i>Danio rerio</i> (Paulistinha)	99
5.3.4.1 Efluentes da produção do TNT	99
5.3.4.2 Efluentes da produção da nitrocelulose	103
5.4 Testes de Toxicidade Crônica	108
5.4.1 <i>Pseudokirchneriella subcaptata</i>	108
5.4.1.1 Efluentes da Produção de TNT	108
5.4.1.2 Efluentes da Produção de Nitrocelulose	111
5.5 Influência de alguns parâmetros físicos nos ensaios ecotoxicológicos	117
5.5.1 Comparação de pH – <i>Daphnia similis</i>	117
5.5.2 Coloração das amostras-teste	119
5.6 Comparação da sensibilidade entre organismos	121
6. CONCLUSÕES	129
7. RECOMENDAÇÕES	130
REFERÊNCIAS	131
APÊNDICES	155

1. INTRODUÇÃO

A evolução das populações é marcada por eventos que podem repercutir por toda a sua trajetória. A revolução industrial do século XX trouxe inúmeros benefícios ao homem na sociedade moderna, novos produtos químicos, matérias primas e bens de consumo passaram a ser produzidos dando mais conforto e praticidade ao homem. No entanto, esse desenvolvimento também proporcionou o surgimento de problemas até então pouco conhecidos, os impactos ambientais ocasionados pelo lançamento dos efluentes industriais em ambientes aquáticos.

Os rios, mares e lagos são o destino final dos efluentes de milhares de indústrias em todo o mundo. A partir da década de 60 notou-se que os resíduos sólidos e líquidos, inerentes aos processos produtivos, passaram a ser encontrados no meio ambiente causando doenças e riscos aos seres humanos e aos demais seres vivos. Uma grande diversidade de compostos orgânicos e inorgânicos encontrados nas águas, seja por lançamento accidental ou não, é resultante do despejo de águas residuárias de uso doméstico e industrial.

Dentre os muitos compostos presentes nessas águas residuárias, podem ser encontrados agentes tóxicos como compostos orgânicos e metais pesados, nutrientes como nitrato e fosfato, além de uma variedade de outras substâncias inorgânicas como cloreto de sódio, amônia, sulfato e sulfitos.

Por muito tempo tem havido uma grande preocupação com a presença de agentes tóxicos em ecossistemas, principalmente nos ambientes aquáticos. Em função disto, o controle e gerenciamento da qualidade ambiental das águas tem assumido um papel relevante.

Por muitos anos as análises físico-químicas foram utilizadas como única ferramenta para avaliação da qualidade das águas, no entanto, nem sempre as respostas fornecidas garantiam a ausência de impacto em ambientes aquáticos. Em virtude disso, o uso de métodos biológicos para avaliação da contaminação aquática mostrou ser uma importante alternativa em casos de poluição difusa ou pontual, com fins de preservação da vida aquática. A partir disso, além dos planos de monitoramento envolvendo análises físicas e químicas, os ensaios biológicos com microrganismos, plantas, invertebrados e peixes estão sendo cada vez mais utilizados como indicadores ambientais.

A toxicidade é uma propriedade que reflete um efeito danoso de um agente químico sobre um organismo vivo. Ela é uma função da concentração e composição/propriedades dos agentes químicos aos quais os organismos são expostos e da duração da exposição (RAND et

al., 1995). A toxicidade de um composto pode ser avaliada através de ensaios, que avaliam os efeitos adversos dos agentes químicos sobre os organismos vivos em condições padronizadas e reproduzíveis. Os efeitos observados, tanto de inibição como de magnificação, podem ser avaliados por reação dos organismos, tais como morte, crescimento, proliferação, multiplicação, mudanças morfológicas, fisiológicas e histológicas.

Os dados gerados nos ensaios de toxicidade são utilizados na avaliação de risco ambiental e regulamentação de novas substâncias químicas, bem como no estabelecimento de critérios de qualidade da água para preservação das comunidades aquáticas e no controle da toxicidade de efluentes líquidos industriais. No tocante ao estudo de efluentes, normalmente compostos por uma mistura de substâncias, os testes de toxicidade permitem observar o efeito tóxico total do efluente, detectando as possíveis interações entre os seus componentes.

Os efeitos de uma exposição podem variar de muito intensos em alguns organismos a mínimo em outros. Alguns organismos morrem enquanto outros sobrevivem quando expostos a um mesmo poluente. Por isso, devem ser utilizados mais de um organismo-teste quando se pretende avaliar a toxicidade de qualquer amostra.

Na produção da nitrocelulose e do 2,4,6-Trinitrotolueno, dois explosivos que além da aplicação militar possuem outras finalidades para uso civil, são utilizadas grandes quantidades de águas para a purificação dos produtos finais de interesse comercial. De maneira geral, os efluentes gerados são ricos em compostos fenólicos, ácidos resinosos, lignina, cloro, compostos clorados, nitrogênio, sulfitos, ácidos resinosos, além de muitos outros. Pouco se sabe sobre a toxicidade dos efluentes gerados, individualmente, em cada etapa da produção desses explosivos, no entanto alguns trabalhos apontam que os mesmos possuem um caráter tóxico.

Com intuito de prever o impacto do lançamento dos efluentes gerados na produção do 2,4,6-TNT e da nitrocelulose sobre organismos de ambientes aquáticos de água doce, torna-se necessário o conhecimento da sua toxicidade através da realização de ensaios ecotoxicológicos envolvendo organismos de diversos níveis tróficos, visto que pode ocorrer diferença de sensibilidade entre os mesmos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Bioensaios de Toxicidade: considerações gerais

As águas naturais são o último destino de muitas substâncias tóxicas geradas por atividades industriais, domésticas e agrícolas. O gerenciamento das substâncias tóxicas que são lançadas nas águas naturais é difícil, em função da sua origem difusa em muitos casos. Embora os organismos aquáticos possuam mecanismos adaptativos a situações adversas, há momentos em que os níveis de contaminação excedem a capacidade de suporte do sistema, passando a afetar a sobrevivência, o desenvolvimento, o crescimento, a reprodução ou o comportamento desses organismos.

Um agente tóxico pode produzir um efeito adverso em sistemas biológicos, danificando seriamente a sua estrutura e funcionamento ou produzindo morte. Esse agente tóxico ou xenobiótico pode ser introduzido deliberadamente ou acidentalmente em ecossistemas aquáticos, diminuindo a qualidade da água tornando-a desfavorável a vida aquática (RAND et al., 1995).

A Ecotoxicologia Aquática é o estudo dos efeitos dos agentes tóxicos – especialmente compostos sintéticos decorrentes das atividades antropogênicas – sobre o meio e a biota aquática em seus diversos níveis de organização: desde os níveis subcelulares, em organismos unicelulares até comunidades e ecossistemas. Esta ampla definição inclui o estudo dos efeitos tóxicos em nível celular, individual, populacional e de comunidade (ADAMS; ROWLAND, 2003; RAND et al., 1995), sendo que a maioria dos estudos realizados atualmente são em nível de indivíduo (ADAMS; ROWLAND, 2003), o que torna difícil a extrapolação dos dados para prever impactos sobre toda uma comunidade.

Os agentes tóxicos podem causar alterações positivas ou negativas nas condições pré-existentes dos organismos. As alterações positivas em baixas doses recebe o nome de hormesis, que significa uma resposta estimulatória a partir de uma baixa dose ou concentração de uma substância não essencial, que resulta em aumento da função biológica dos organismos individuais, mas que em altas doses de concentrações produzem efeitos tóxicos (KEFFORD et al., 2007).

No entanto, a Ecotoxicologia aquática está interessada naquelas alterações que podem ser consideradas como adversas na natureza e na recuperação de processos da biota. Os efeitos adversos em nível de organismo incluem danos letais tanto de curto como de longo prazo

(expressos como mortalidade ou sobrevivência), e efeitos subletais como as mudanças no comportamento, crescimento, desenvolvimento, reprodução e detoxificação, além da estrutura de tecidos. Os efeitos adversos em nível de sub-organismos incluem indução ou inibição de enzimas e/ou sistemas de enzimas e suas funções associadas. Em nível de supra-organismos, esses efeitos adversos incluem mudanças no genótipo e/ou fenótipo das espécies, assim como, mudanças no número da abundância relativa e das condições fisiológicas das espécies tipicamente encontradas em uma comunidade (RAND et al., 1995).

Nos ensaios de toxicidade, organismos são expostos durante um determinado período a uma série de concentrações do agente tóxico (substância química, efluente, elutriado, lixiviado ou água superficial), segundo condições estabelecidas por métodos padronizados, medindo-se a proporção de organismos afetados, através do grau de efeito observado sobre variáveis biológicas como sobrevivência, crescimento, reprodução e comportamento. Essas variáveis biológicas dependem da espécie utilizada e do tipo de teste e, em função deste último, varia a abordagem estatística empregada no cálculo (BURATINI, 2002; CAIRNS; MOUNT, 1990; RAND et al., 1995;). O princípio fundamental no qual todos os testes de toxicidade estão baseados é o reconhecimento de que a resposta de um organismo vivo a presença (exposição) de agentes tóxicos é dependente, sobretudo, da dose (nível de exposição) a esse agente e do tempo de exposição (ADAMS; ROWLAND, 2003).

Como a exposição aos agentes tóxicos pode ser via água, sedimento e alimento no meio aquático, as concentrações, quantidades e biodisponibilidade dos agentes tóxicos nesse compartimento são uma preocupação primária. O estudo das fontes, transporte, distribuição, transformação orgânica e inorgânica dos agentes tóxicos no meio ambiente aquático é um componente vital de Ecotoxicologia.

O gerenciamento ecotoxicológico dos ambientes aquáticos pode fazer uso dos bioensaios, biomarcadores ou indicadores *in situ*, dependendo do assunto em debate e das questões que estão sendo argüidas. O papel dos testes de toxicidade é prever os efeitos dos agentes químicos sobre os organismos vivos, comparando a sensibilidade de uma ou mais espécies a diferentes agentes químicos estabelecendo assim, uma diretriz para o lançamento dos despejos industriais (KOIVISTO, 1995).

Em todos os casos, as análises químicas tornam-se um componente essencial das investigações ecotoxicológicas, representando uma tentativa de relatar os efeitos observados em contaminações pontuais, além de avaliar os possíveis prejuízos destes lançamentos ao corpo receptor. Abordagens *in situ* tendem a determinar o status de saúde de um ecossistema

aquático, em particular através da medida dos índices estruturais e funcionais ao nível das populações bióticas (BLAISE, 2003).

As informações geradas com os testes de toxicidade podem ser utilizadas no gerenciamento da poluição com o propósito de (a) predição dos efeitos ambientais de um resíduo, (b) comparação dos agentes tóxicos ou animais ou condições de teste ou (c) regulamentação das descargas (BUIKEMA JUNIOR et al., 1982).

2.2 Evolução dos bioensaios

Há várias perspectivas sobre a origem, desenvolvimento e marcos da Ecotoxicologia aquática. Segundo Rand et al. (1995), existem dados históricos que fazem referência a publicações bem antigas como de Orfila (1787-1853), que publicou em 1815 um livro clássico sobre os efeitos deletérios dos agentes químicos sobre os organismos. Esse autor discutiu, em sua publicação, aspectos relevantes de toxicologia que são reconhecidos até os dias de hoje. Registros mostram que os primeiros testes de toxicidade com despejos industriais foram realizados entre 1863 e 1917 (ZAGATTO, 2006).

Alguns autores acreditam que os estímulos ao desenvolvimento da ecotoxicologia foram os estudos sistemáticos com a toxicologia de mamíferos, que teve seu início em 1920. Na década de 30 foram implementados alguns testes de toxicidade com organismos aquáticos, com o objetivo de estabelecer a relação causa/efeito de substâncias químicas e despejos líquidos (RAND et al., 1995). Na década de 40, os peixes foram os organismos escolhidos para avaliar a toxicidade de despejos líquidos (ZAGATTO, 2006). Com a revolução industrial, os problemas ecotoxicológicos começaram a se manifestar, no entanto, as ferramentas para avaliar os danos causados pelas indústrias aos ambientes aquáticos, apesar de já existirem, eram rudimentares (BLAISE et al., 1998). Nos anos 50 e 60, além de identificarem os agentes tóxicos e suas fontes poluidoras, começaram a ser estabelecidos em diversos países, critérios e padrões para o lançamento dos agentes poluidores de modo a manter a qualidade dos corpos aquáticos (ZAGATTO, 2006).

Paralelamente ao desenvolvimento da ecotoxicologia, há de se considerar a história da evolução dos bioensaios de toxicidade. Apesar de haver dados sobre a realização de experimentos com bactérias em 1672, os primeiros organismos a serem utilizados foram os peixes e macroinvertebrados. Esses organismos, utilizados na década de 1960, estão na categoria dos macrobiotestes, que foram os precursores dos microbiotestes. Estes últimos,

testes em pequena escala ou qualquer dos seus sinônimos (microbiotestes, microbioensaios, teste em microescala, microteste ou biotestes de segunda geração) foram caracterizados por envolver a exposição de um organismo unicelular ou um pequeno organismo multicelular a uma amostra líquida para medir um efeito específico (BLAISE et al., 1998).

Tão logo foi verificado que a toxicidade é específica a um nível trófico, concluiu-se que não poderiam ser realizados ensaios toxicológicos apenas com um representante da cadeia trófica, por exemplo, com peixes (consumidores secundários) (BLAISE et al., 1996; KRAMER; BOTTERWEG, 1991). A partir disto e das necessidades de desenvolvimento de testes de monitoramento de baixo custo e organismos de vários níveis da cadeia trófica, iniciou-se a utilização dos microbiotestes. Estes testes envolvendo bactérias, microalgas, protozoários e microinvertebrados, começaram a surgir, na década de 70, após a implementação dos macrobiotestes (BLAISE et al., 1986; BLAISE, 1996). Mesmo com o surgimento dessa última modalidade de teste, os macrobiotestes ainda estão em uso devido a sua aplicabilidade e eficácia em demonstrar o efeito de xenobióticos perigosos.

Prosseguindo com a história da ecotoxicologia, ainda na década de 60, o *Water Quality Act* – USA estabeleceu os primeiros padrões de qualidade das águas para proteção da vida aquática baseados em testes de toxicidade aguda (ZAGATTO, 2006). Na década de 70 foram criadas agências ambientais em diversos países industrializados (USEPA e Environment Canadá, National Swedish Environment Protection Board). Na década de 80, foram desenvolvidos ensaios de toxicidade de curta duração, com as fases mais sensíveis de alguns organismos, com o intuito de aumentar a eficiência e minimizar custos. Nas décadas 80/90, surgiram os estudos para validação de resultados entre os testes de toxicidade feitos em laboratório com aqueles feitos *in loco*, utilizando espécies representativas do ambiente. Nessa época também ocorreu à implementação de testes de toxicidade para estabelecimento de padrões de qualidade das águas e de lançamento dos efluentes líquidos, além dos testes bioquímicos, biosensores e biomarcadores (ZAGATTO, 2006).

A partir daí, vários anos se passaram para a regulamentação, implementação e padronização dos testes de toxicidade, com o objetivo de fazer uma combinação de bioensaios e testes químicos para avaliar o impacto do lançamento de águas residuárias em corpos receptores. Essa iniciativa contribuiu significativamente para o desenvolvimento de novos bioensaios nos anos que se seguiram (BLAISE, 1996) e da Ecotoxicologia como ciência.

No Brasil, a Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) vem realizando ensaios de ecotoxicidade desde a década de 70, com início no ano de 1975. No ano de 1976 foi editado o Decreto 8468, de 8 de setembro de 1976, do Estado de

São Paulo que aprova o regulamento da Lei nº 997, de 31 de maio de 1976, que estabelece os padrões numéricos de substâncias, visando assegurar a qualidade das águas interiores. Em 1975 a CETESB já estava preocupada e preparando-se para manter um laboratório de ensaios biológicos. As atividades neste campo iniciaram-se de fato através de uma solicitação da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) à CETESB, para participar de um programa internacional de padronização de métodos de testes de toxicidade com peixes (CETESB, 1991). Somente em 1987, a ABNT, por meio dos trabalhos desenvolvidos pelo GT02 (Grupo de Toxicidade) da Comissão Técnica de Qualidade das Águas, começou a publicar suas primeiras normas relativas a testes ecotoxicológicos com organismos aquáticos (ZAGATTO, 2006). A partir daí, outros testes com variedades diversas de peixes e outros organismos foram implementados, divulgados e atualmente são de uso geral para os ensaios de toxicidade.

2.3 Testes de toxicidade aguda e crônica

De acordo com a duração da exposição ou em função da fase do ciclo vital, os testes de toxicidade são divididos em agudos e crônicos. Os testes de toxicidade aguda são testes de curta duração, utilizados para medir os efeitos dos agentes tóxicos em espécies aquáticas, durante uma parte do seu ciclo de vida. Esses testes avaliam efeitos na sobrevivência em períodos de até 96 h (ADAMS; ROWLAND, 2003; RAND et al., 1995) ou alguma outra manifestação do organismo que antecede a sua morte, como por exemplo, o estado de imobilidade em alguns microcrustáceos (ADAMS; ROWLAND, 2003; CETESB, 1992).

Para avaliar os efeitos agudos de agentes tóxicos em testes de toxicidade usa-se, geralmente, a Concentração Letal (CL50) – concentração capaz de matar 50% da população - ou a Concentração Efetiva (CE50) a 50% dos organismos em teste – concentração capaz de imobilizar ou produzir um outro efeito em 50% da população (ADAMS; ROWLAND, 2003; CETESB, 1992; RAND et al., 1995). Há muitas situações em que a morte é difícil de ser determinada. Nesses casos então, os dados podem ser expressos como CE50 ao invés de CL50, pois, a CE50 é menor do que a CL50 devido aos efeitos causados no funcionamento dos organismos antes da sua morte. Os testes de toxicidade aguda podem fornecer uma comparação significativa da letalidade dos agentes tóxicos entre organismos ou condições de teste. Eles podem monitorar a letalidade de misturas complexas para um dado organismo-teste (BUIKEMA JUNIOR et al., 1982).

As espécies mais frequentemente utilizadas em testes de toxicidade aguda na América do Norte incluem: peixes (*Pimephales promelas*), (*Oncorhynchus mykiss*), (*Lepomis macrochirus*), (*Ictalurus punctatus*), (sheepshead minnows) (*Cyprinodon variegatus*), *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia dubia*, anfípodas (*Hyalella azteca*), insetos (*Chironomus* sp.), planta aquáticas (*Lemna* sp.), algas verdes de água doce (*Pseudokirchneriella subcapitata*), algas marinhas (*Skeletonema costatum*), mayflies (*Hexagenia* sp.), misidáceos (*Mysidopsis bahia*) peneídeos (*Penaeus* sp.), (*Palaemonetes pugio*), anfípodas marinhos (*Rhepomyius aboroni* e *Ampleisca abdita*), vermes marinhos (*Nereis virens*), ostras (*Crassostrea virginica*), mexilhão (*Mytilus edulis*) e moluscos marinhos (*Macoma* sp.) (ADAMS; ROWLAND, 2003).

Algumas dessas espécies também são utilizadas em ensaios de toxicidade no Brasil, além de *Hydra attenuata*, *Daphnia similis*, *D. laevis*, *Ceriodaphnia silvestrii*, *C. cornuta*, *Chironomus xanthus* e *Pistia stratiotes*.

Há situações em que os testes de toxicidade aguda não podem assegurar níveis de proteção adequados. Nessa situação são indicados, então os testes de toxicidade crônica. Os testes de toxicidade crônica são designados para medir os efeitos dos agentes tóxicos a espécies aquáticas levando em conta uma significativa porção do seu ciclo de vida (ADAMS; ROWLAND, 2003)

De modo geral, porém não exclusivo, esses efeitos subletais são observados em situações em que as concentrações do agente tóxico permitem a sobrevivência do organismo, embora afetem uma ou várias de suas funções biológicas, tais como reprodução, desenvolvimento de ovos, crescimento e maturação, dentre outras (CETESB, 1992; RAND, et al., 1995). Normalmente, os efeitos crônicos causam alterações nos organismos, que precedem a sua morte. A duração dos ensaios de toxicidade crônica é função do ciclo de vida dos organismos em estudo. Em um teste completo, um organismo pode ser exposto por todo o seu ciclo de vida, isto é, de ovo a ovo. A exposição geralmente inicia-se com o ovo ou zigoto e continua durante o desenvolvimento e maturidade do embrião, crescimento, desenvolvimento dos organismos jovens, maturidade sexual e a reprodução até a segunda geração (RAND, et al., 1995).

Para avaliar os efeitos dos testes de toxicidade crônica, determina-se a Concentração de Efeito Não Observado (CENO) – a maior concentração da amostra que não causa efeito deletério estatisticamente significativo, em relação ao controle na sobrevivência e reprodução dos organismos nas condições de ensaio, e a Concentração de Efeito Observado (CEO) – a menor concentração da amostra que causa efeito deletério, estatisticamente significativo, em

relação ao controle na sobrevivência e reprodução dos organismos. CEO e CENO são determinadas examinando-se os dados e comparando-os com o controle, a fim de se detectar diferenças significativas via teste de hipóteses. Os efeitos podem ser: mortalidade, imobilização, redução da contagem de células (algas e bactérias) ou observações de alterações comportamentais. Esses resultados são determinados utilizando-se T-testes e análise de variância (ANOVA) e são muito freqüentemente associados com os testes de toxicidade crônica (ADAMS; ROWLAND, 2003).

Exemplos de espécies utilizadas em testes de toxicidade crônica incluem: peixes (*Salvelinus fontinalis*), dafnídeos (*Daphnia magna*), (*Ceriodaphnia dubia*), oligoquetas (*Lumbriculus variegatus*), insetos (*Chironomus tentans*) e misidáceos (*Americamysis bahia*).

Como já mencionado anteriormente, nos estudos que abrangem o ciclo de vida parcial ou total dos organismos, os resultados de interesse são expressos como valores de CEO/CENO ou CL_x . A média geométrica da CEO e do CENO tem sido referida como a máxima concentração aceitável do agente tóxico. Mais recentemente, esse termo tem sido referido como valor crônico (VC), que é definido como a concentração (limiar) na qual os efeitos crônicos são primeiro observados (ADAMS; ROWLAND, 2003).

Os testes de toxicidade com algas tem, normalmente, duração de 3 a 5 dias e são freqüentemente reportados como testes de toxicidade crônica, pois as algas se reproduzem muito rápido, de modo que várias gerações são expostas durante um período de ensaio. Em tal situação também se enquadram as bactérias, já que durante um teste com duração de 6 ± 2 h várias gerações são produzidas.

Várias organizações reguladoras oficiais (USEPA, OECD, MITI), juntamente com os setores industriais e acadêmicos, além de organizações de pesquisa, têm desenvolvido e padronizado métodos em cooperação com organizações de padronização internacional (ISO, CEN) e nacionais (DIN, NNI e ASTM).

Quanto aos sistemas de testes empregados, tem-se a seguinte classificação:

- a) Teste estático: não há renovação das soluções durante o período de teste;
- b) Teste semi-estático: as soluções-teste são renovadas periodicamente, geralmente a cada 24 h;
- c) Teste de fluxo contínuo: as soluções-teste fluem continuamente através dos recipientes onde se encontram os organismos.

Além dos testes rotineiramente realizados com amostras de água doce e marinha, também são feitos testes com amostras de sedimentos devido a sua capacidade de acumular alguns contaminantes reduzindo, a sua biodisponibilidade. Muitas vezes, os agentes tóxicos que

ficam adsorvidos nos sedimentos afetam os organismos que vivem nesse habitat. Além disso, em determinadas situações, eles podem ser liberados para a coluna d'água. Por causa disso, ultimamente tem havido um grande interesse pela realização de testes de toxicidade e de bioacumulação com amostras de sedimentos (BURATINI, 2002).

2.3.1 Organismos-teste e sua sensibilidade

A finalidade do uso dos testes de toxicidade no biomonitoramento é prever com eficiência, a concentração que não causa prejuízo a um sistema e fazer esta predição de uma maneira efetiva e com baixo custo (BUIKEMA JUNIOR et al., 1982). Uma combinação de critérios é utilizada para a seleção das espécies, eles incluem aspectos, econômico/prático e facilidade de cultivo, sensibilidade, ampla distribuição geográfica, abundância, importância ecológica e relevância do organismo indicador para os propósitos do estudo a ser realizado. Todos esses critérios são comumente utilizados para a seleção de espécies em estudos de toxicidade nos laboratórios (APHA, 1999; RONCO et al., 2004).

Um fator que deve ser considerado e que limita o emprego dos organismos vivos como indicadores de toxicidade, é a diferença de sensibilidade apresentada pelos organismos frente aos compostos químicos ou efluentes (FARRE; BARCELÓ, 2003).

Diferenças substanciais podem existir entre os organismos de uma população homogênea. Essas diferenças tornam-se evidentes quando os organismos sofrem mudanças após exposição a uma substância química ou um estresse potencialmente tóxico. Nem todos os organismos respondem de uma mesma maneira à mesma concentração de um agente tóxico. Os efeitos da exposição podem variar de muito intenso, em alguns organismos, a mínimo ou nenhum em outros organismos. Muitos organismos podem morrer e outros sobrevivem com aparentemente mínimos efeitos adversos. Essas diferenças nas respostas são devido à variação biológica natural, refletindo a constituição genética da população e dos indivíduos. A variação normalmente é pequena para organismos da mesma espécie e de mesma idade, e geralmente grande para organismos de espécies diferentes (RAND et al., 1995).

Uma outra hipótese sobre a variabilidade dos resultados de ensaios ecotoxicológicos foi proposta por Vaal et al. (1997a,b) e Jager et al. (2007). Segundo eles a variação toxicológica dos dados é determinada pela diferença na toxicidade dos compostos e não pelas diferenças intrínsecas entre espécies, ou seja, o que influí na sensibilidade é o modo de ação dos compostos. Para isso, os referidos autores desenvolveram um esquema capaz de classificar os

agentes químicos como segue baseado no seu modo de ação: (1) químicos inertes, (2) químicos menos inertes, (3) químicos reativos e (4) químicos de ação específica.

Além da variação à sensibilidade dos organismos em ensaios ecotoxicológicos estar ligada ao modo de ação do agente tóxico, Vaal et al. (1997b) pressupõem que outros fatores estejam associados como: à classificação dos agentes químicos (àqueles compostos que pertencem a um mesmo grupo devem produzir menor variabilidade dos resultados entre espécies) e variação nas vias metabólicas de detoxificação dos compostos (compostos que precisam de pouca ou nenhuma degradação metabólica para sua excreção, podem resultar em pouca ou nenhuma diferença de sensibilidade entre espécies, ao contrário dos que precisam de uma extensa degradação metabólica, antes da sua excreção e variação, devido aos diversos locais de atuação que cada composto possui).

Para Vaal et al. (1997a) até o tempo de exposição pode interferir na sensibilidade: a toxicidade pode aumentar com o aumento do tempo de exposição até que seja alcançado um equilíbrio entre a concentração interna e externa do agente tóxico. Para grandes espécies e compostos mais hidrofóbicos o tempo de exposição de 48-96 h pode ser muito pequeno para que o equilíbrio seja alcançado.

Alguns esforços têm sido feitos com o objetivo de encontrar uma espécie que seja sensível a maior parte dos compostos químicos (FARRE; BARCELÓ, 2003). Deve-se enfatizar que a idéia é se dispor de um organismo mais sensível à maioria dos compostos avaliados, e não uma única espécie sensível a todos os compostos.

A procura por bioindicadores apropriados tem se tornado uma necessidade para avaliar os níveis de poluição em ecossistemas naturais, onde os contaminantes mais ocorrem em misturas do que sozinhos. Embora várias espécies possam ser utilizadas como bioindicadoras, a escolha das espécies e dos testes depende muito da localização e do propósito da avaliação, ou seja, qualidade da água, impactos ecológicos, entre outros. De qualquer maneira, as espécies mais sensíveis não deveriam ser utilizadas se não representarem adequadamente o ecossistema (SANCHEZ-BAYO, 2006).

Pascoe et al. (2000) ao realizarem um estudo para modificar e/ou desenvolver novos métodos para avaliação da toxicidade em espécies de água doce, concluíram que para cada um dos agentes tóxicos testados (cobre, lindane e atrazina) uma espécie foi mais sensível em relação às demais. Esses resultados também demonstram a necessidade não somente do desenvolvimento de novos testes, mas um aumento da variedade de espécies-teste para maximizar a oportunidade de identificar agentes químicos. Além do mais, existem diferenças de sensibilidade entre organismos do mesmo (BLAISE, 1996; MARSALEK, 1999;

ROJIECKOVÁ-PADRTOVÁ, 1998) e de diferentes níveis tróficos (FARRÉ; BARCELLÓ, 2003; PASCOE et al., 2000).

Walsh et al. (1982) determinaram o efeito dos efluentes de 10 diferentes tipologias industriais sobre as algas *Selenastrum capricornutum* (água doce) e a alga *Skeletonema costatum* (marinha). Os resultados dos ensaios de toxicidade obtidos para estas algas foram comparados aos resultados de toxicidade de duas espécies de microcrustáceos considerados sensíveis à poluição: *Daphnia magna* (água doce) e *Mysidiopsis bahia* (marinha), também testadas com as mesmas amostras de efluentes. Os resultados indicaram que todas as amostras afetaram o crescimento algal, tanto pela estimulação como pela inibição em baixas e altas concentrações, respectivamente. As espécies algais foram mais sensíveis às águas residuárias testadas do que *Daphnia magna* e *Mysidiopsis bahia*. Das dez amostras avaliadas, somente três foram tóxicas a *Daphnia magna* e duas a *Mysidiopsis bahia*.

Rojiecková-Padrtová et al. (1998) utilizaram testes de toxicidade alternativos e padronizados, para avaliar a toxicidade aguda de cinquenta amostras de diversas origens. As espécies-testes utilizadas nos ensaios alternativos foram o crustáceo *Thamnocephalus platyurus* e *Ceriodaphnia dubia*, o rotífero *Brachionus calyciflorus*, o protozoário *Spirostomum ambiguum* e a bactéria *Vibrio fischeri*. Os testes padronizados utilizados foram a microalga *P. subcaptata*, o microcrustáceo *Daphnia magna* e o peixe *Poecilia reticulata* como organismos teste. As espécies de maior sensibilidade foram a alga *P. subcaptata*, o microcrustáceo *C. dubia* e o protozoário *S. ambiguum*. O peixe *P. reticulata* foi o organismo com menor sensibilidade. A partir dos resultados obtidos, foi selecionada uma bateria de testes para avaliação da toxicidade de amostras ambientais, incluindo representantes mais sensíveis dos diferentes níveis tróficos.

A CETESB (1987a) realizou um estudo com 82 amostras de efluentes industriais, 25 amostras de corpos d'água receptores e 1 amostra do efluente final da Estação de Tratamento de Esgotos do Ipiranga/SP, no período de 1984 a dezembro de 1986. Para avaliação da toxicidade aguda, utilizou-se *Spirillum volutans* (perda da motilidade), *Photobacterium phosphoreum* (inibição da capacidade de emitir luz) e *Pseudomonas fluorescens* (inibição do crescimento da cultura). Os resultados obtidos indicaram que: *Photobacterium phosphoreum* (sistema Microtox) e *Spirillum volutans* foram os que apresentaram melhores resultados, tendo-se verificado boa concordância em termos qualitativos com os resultados do bioensaio tradicional com *Daphnia similis*. O bioensaio com sistema Microtox mostrou-se mais sensível que o bioensaio com *Spirillum volutans*, apresentando também melhor concordância com os resultados obtidos com o bioensaio com *Daphnia similis* (90% de concordância).

Em 1990, a CETESB também desenvolveu um estudo para determinar se o lançamento de substâncias tóxicas estava afetando o sistema aquático do rio Paraíba do Sul/SP. Foram coletadas amostras de água superficiais e do sedimento do Rio Paraíba do Sul, desde o município de Paraibuna até o sul fluminense. Foram selecionadas indústrias cujos efluentes apresentaram potencial tóxico em virtude da sua composição. Para os ensaios agudos foram utilizados *Spirillum volutans*, *Microtox*, *Daphnia similis* e *Danio rerio* e para toxicidade crônica *Ceriodaphnia dubia*.

De maneira geral, observou-se que existiu uma variação dos resultados de toxicidade aguda nos efluentes avaliados em função do organismo utilizado. O organismo-teste mais sensível foi *D. similis*, sendo que o uso da bactéria *S. volutans* foi descartado pela CETESB. Estudos realizados em peixes no Rio Paraíba do Sul, no Estado do Rio de Janeiro, revelaram impacto significativo adverso. Os efluentes das dez indústrias avaliadas apresentaram toxicidade crônica.

A partir dos diversos estudos apresentados até aqui, pode-se concluir que o efeito tóxico de um efluente sobre um organismo de determinada espécie não pode ser simplesmente extrapolado para outras espécies. Portanto, a avaliação da toxicidade de efluentes não deve ser realizada apenas por um ensaio com uma única espécie (BLAISE, 1996; KENEGA, 1978; ISOMAA, 1995; LILIUS; PASCOE et al., 2000). Sponza (2003) também propôs a utilização dos testes de toxicidade em bateria como a melhor abordagem para avaliar o risco de impacto dos efluentes. Os dados gerados nesses ensaios são índices confiáveis para prever o impacto tóxico dos efluentes nos ambientes aquáticos.

Devido a grande quantidade de compostos tóxicos que podem estar presentes nas águas residuárias e da variedade de organismos vivos que podem ser afetados pela descarga dessas águas contendo poluentes perigosos, ferramentas eficientes para a detecção da toxicidade precisam ser encontradas (BLUM; SPEECE, 1990). O objetivo da Ecotoxicologia não é proteger apenas uma espécie, mas uma comunidade formada por diversas espécies, visto que nem todas possuem igual sensibilidade a um agente tóxico (KEFFORD et al., 2007).

2.3.2 Ensaios de toxicidade com produtores primários: algas

Nas imensas extensões de águas doces e marinhas que cobrem o Planeta Terra destaca-se a diversidade de organismos, de certa forma relacionada à diversidade das comunidades de algas. Nos sistemas aquáticos as algas incorporam energia solar em biomassa, produzem o

oxigênio que é dissolvido na água e usado pelos demais organismos aquáticos, atuam na mineralização e no ciclo dos elementos químicos, e servem como alimento para animais herbívoros e onívoros. Quando morrem, seus constituintes químicos sofrem transformações nos sedimentos, são solubilizados e reciclados na água. Alterações no ecossistema aquático, de origem natural ou antropogênica, podem alterar o balanço destes fatores controladores e causar mudanças na composição da comunidade de algas, nas taxas de produtividade, na biomassa e na química da água. Tanto a inibição como a estimulação do crescimento dos organismos são indesejáveis, pois qualquer alteração na produtividade das algas ou na composição da comunidade, em relação ao usual para aquele sistema em particular, pode ameaçar todo o equilíbrio do ecossistema (VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004).

Como espécies representativas do nível trófico inferior, as algas são ecologicamente importantes, porque servem como fonte de alimento fundamental para outras espécies aquáticas e são os produtores primários tornando-se um elo importante na cadeia alimentar e essenciais à “economia” dos ambientes aquáticos como alimentos (VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004). A utilização de microalgas em testes de toxicidade apresenta grande importância, uma vez que qualquer alteração na composição específica da comunidade fitoplantônica pode afetar a estrutura e a função de todo o ecossistema. Através dos testes com algas podem-se obter informações a respeito da disponibilidade de substâncias químicas para esses organismos, e seus efeitos estimuladores ou inibidores, sendo o crescimento a resposta que retrata esses efeitos (MASUTTI, 2004).

O crescimento populacional é um indicativo dos processos celulares, ele reflete efeitos tóxicos em numerosas funções biológicas. Vários ensaios de toxicidade baseados na inibição do crescimento têm sido desenvolvidos para medir os efeitos ambientais de substâncias tóxicas (BITTON; DUTKA, 1986a). A inibição do crescimento de uma população de algas é utilizada como um indicador de toxicidade.

A principal desvantagem dos métodos algais é a falta de reprodutibilidade entre ensaios consecutivos. Como vantagens podem-se citar: menor variabilidade genética (se comparados às bactérias), facilidade de execução dos testes (se comparados aos peixes), maior sensibilidade e facilidade de cultivo das algas.

Alguns autores sugerem que o uso de espécies sensíveis é mais importante que o uso de espécies nativas, enquanto outros sugerem que o uso de organismos padronizados é mais importante que o uso de espécies sensíveis ou nativas (ROJIECKOVÁ-PADRTOVÁ; MARSALEK, 1999). O ideal é que se escolha organismos que forneçam respostas confiáveis e impeçam impactos tóxicos .

Pseudokirchneriella subcaptata, é uma espécie unicelular de alga verde que ocorre em ambientes de água doce e que é mundialmente utilizada como organismo-teste nos ensaios ecotoxicológicos em protocolos recomendados pela EEC, ISO, OECD dentre outros (McLARNON-RICHES et al., 1998). Ela foi isolada pela primeira vez na Noruega, em 1959. É a espécie de alga sobre a qual a técnica de cultivo e dados são mais bem conhecidos em função de sua utilização em testes de toxicidade desde a década de 60 (GRAHAM e WILCOX, 2000; LEWIS, 1993). Nestes testes normalmente são avaliados parâmetros como biomassa, taxa de crescimento e ainda modificações morfológicas na cor, tamanho e forma. Diversas agências reguladoras nacionais e internacionais apresentam normas de padronização para testes de toxicidade – ISO, ABNT, EPA e OECD (MASUTTI, 2004).

A CETESB (1986a) realizou um estudo sobre a toxicidade dos efluentes gerados em várias indústrias de pasta de celulose utilizando espécies-teste de microcrustáceos *D. similis*, peixe *Cheirodon notomelas* e alga *Chlorella vulgaris*. Os resultados obtidos demonstraram que *D. similis* e *C. notomelas* são espécies adequadas para a avaliação da toxicidade dos efluentes estudados. No entanto, os ensaios biológicos com algas não foram os mais recomendados, devido às dificuldades metodológicas encontradas no preparo das amostras e desenvolvimento dos testes.

Rojiecková-Padrtoová e Marsalek (1999) avaliaram a sensibilidade de 7 espécies algais representantes dos grupos das algas verdes e azuis, utilizando testes de inibição de crescimento em microplacas. As substâncias-teste utilizadas foram três compostos metálicos ($K_2Cr_2O_7$, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ e $ZnSO_4$) e três formulações de herbicidas (*oxifluorfen*, *pendimethalina* e atrazina). As algas verdes foram divididas em dois grupos: o primeiro contendo as espécies *Chlorella kessleri* e *Stichococcus bacillaris*, tolerantes a herbicidas e o segundo grupo, com as espécies mais sensíveis: *P. subcaptata*, *Scenedesmus quadricauda*, *Scenedesmus subspicatus* e *Chlamydomonas reinhardtii*. No primeiro grupo as espécies foram mais tolerantes aos herbicidas. No segundo grupo, não houve diferença na sensibilidade das espécies testadas, qualquer uma delas poderia ser igualmente recomendada como organismo-teste em ensaios algais, desde que fossem utilizadas em baterias de 2 ou 3 espécies.

2.3.3 Ensaios de toxicidade com consumidores primários: microcrustáceos

Os Branchiopoda são primariamente de águas doces, mas incluem também algumas formas em águas interiores salobras e estuarinas, como alguns Anostraca. Os Cladocera, que

são os Branchiopoda mais evoluídos, atingem maior diversificação ecológica. São vulgarmente conhecidos por pulgas d'água e têm grande representatividade nos corpos de água lênticos de todo o mundo e também do Brasil. Estima-se cerca de 600 espécies em todo o mundo e 150 de ocorrência no Brasil. A maioria das espécies tem tamanho compreendido entre 0,5 a 3,0 mm. A maioria dos Cladocera é de hábito rastejador ou bentônico, movendo-se entre os detritos na região litorânea de lagos e de reservatórios, mas há famílias predominantemente de hábito planctônico alimentando-se de algas, bactérias e outras partículas em suspensão (ROCHA; GUNTZEL, 1999).

As famílias que ocorrem no estado de São Paulo são: Sididae, Daphnidae (espécies *Ceriodaphnia cornuta*, *C. silvestrii*, *C. reticulata*, *Daphnia gessneri* e *Daphnia laevis*), Bosminidae e Macrothricidae. Essas espécies ocorrem em diferentes tipos de corpos aquáticos, embora o maior número de ocorrência de espécies planctônicas (famílias Sididae, Daphnidae, Moinidae e Bosminidae) seja em reservatórios de médio a grande porte construído nas bacias hidrográficas dos rios Tietê, Grande, Paranapanema e Paraná. Os Cladóceras são abundantes em água doce. Apresentam alta produtividade secundária representando, juntamente com outros grupos que compõem o zooplâncton, o elo intermediário da cadeia alimentar, através do qual a energia flui para os níveis tróficos superiores, chegando até os peixes, aves aquáticas e o homem (RAND et al., 1995; ROCHA; GUNTZEL, 1999).

2.3.3.1 *Daphnia*

A seleção de cladóceros, especialmente os pertencentes à ordem Anomopoda, família Daphniidae, deve-se aos seguintes fatores: ampla distribuição em habitats dulciaquícolas; comportam-se como importantes herbívoros (através da ingestão de algas e bactérias) constituindo uma fração significativa da dieta de numerosas espécies de peixes e outros predadores; estabilidade genética (a reprodução partenogenética é uma característica importante pois, reduz a variabilidade genética, aumentando a reprodutibilidade dos resultados); apresentam ciclos vitais relativamente curtos e pequena dimensão corpórea, requerendo pequenos volumes de água, o que facilita seu cultivo e manutenção em laboratório, permitindo sua disponibilidade permanente e sensibilidade a um amplo espectro de substâncias (BURATINI, 2002; ZAGATTO, 1988).

O gênero *Daphnia* tem sido amplamente utilizado para a avaliação da toxicidade de produtos químicos, efluentes líquidos, amostras ambientais, lixiviados de resíduos sólidos e

no estabelecimento de critérios de qualidade de água (ZAGATTO, 1988). *Daphnia magna* Straus, 1820 (Cladocera, Crustácea), é um microcrustáceo planctônico, de 5 a 6 mm de comprimento, que atua como consumidor primário na cadeia alimentar aquática e se alimenta por filtração de material orgânico particulado em suspensão (NBR 12713/04). Esse microcrustáceo foi amplamente utilizado em testes de toxicidade na década de 40 e, nos últimos vinte anos tem sido extensivamente empregado em testes de toxicidade padronizados e em pesquisas ecotoxicológicas (ZAGATTO, 1988).

Daphnia similis Straus, 1820 (Cladocera, Crustacea), é um microcrustáceo planctônico, com comprimento máximo de 3,5 mm, que atua como consumidor primário na cadeia alimentar aquática e se alimenta por filtração de material orgânico particulado em suspensão. Os organismos deste gênero são vulgarmente conhecidos como pulga-d'água e têm larga distribuição no hemisfério norte (NBR 12713/04). Esse microcrustáceo tem mostrado boa sensibilidade frente aos efluentes industriais de diversas origens (CETESB, 1987a; CETESB, 1987b).

2.3.3.2 *Ceriodaphnia*

Recomenda-se a utilização de testes de toxicidade crônica de curta duração para evitar situações em que os testes de toxicidade aguda não caracterizem níveis adequados de proteção. Assim, os tradicionais testes com peixes, e mesmo com *Daphnia magna*, tornaram-se limitados e difíceis de serem aplicados rotineiramente, devido à duração prolongada (o teste crônico com o microcrustáceo, por exemplo, demanda 21 a 28 dias para ser concluído) e aos altos custos associados. Com isso, em substituição a esses testes tradicionais, pesquisadores da USEPA propuseram uma série de testes de curta duração, entre os quais o teste crônico de 7 dias, semi-estático, avaliando a sobrevivência e reprodução de outro daphnídeo, *Ceriodaphnia dubia* (BURATINI, 2002; COONEY, 1995; VERSTEEG et al., 1997).

Espécies do gênero *Ceriodaphnia* são morfologicamente semelhantes às do gênero *Daphnia*, só que menores, mais arredondadas e com ciclo de vida mais curto, o que permite maior rapidez de respostas nos testes de toxicidade crônica (7 dias) (RAND, 1995). Os membros do gênero *Ceriodaphnia* são abundantes e amplamente distribuídos nos continentes Norte Americano e Europeu (VERSTEEG et al., 1997), sendo consideradas por alguns autores como espécie cosmopolita. Pouco utilizada até 1984, seu uso cresceu bastante,

principalmente em testes de toxicidade aguda e crônica com efluentes industriais, produtos químicos e águas superficiais. *Ceriodaphnia dubia* tem sido cultivada e testada com sucesso em águas naturais e sintéticas de durezas variadas, desde 20 a 25 mg.l⁻¹ (águas moles) até 160 a 180 mg.l⁻¹ (águas duras) (RAND; PETROCELLI, 1985).

Versteeg et al. (1997) compararam a sensibilidade de *Ceriodaphnia* sp. e outras espécies de Cladóceros, incluindo *Daphnia magna* e *Daphnia pulex*. Baseado nos dados obtidos de toxicidade aguda e crônica a uma ampla gama de materiais testados, incluindo metais, compostos orgânicos e efluentes, pôde-se concluir que os membros do gênero *Ceriodaphnia* e *Daphnia* podem ser considerados equivalentes em termos de sensibilidade na avaliação do risco ambiental.

2.3.4 Ensaios de toxicidade com consumidores secundários: peixes

Muitos testes de toxicidade avaliam o impacto dos efluentes nos ambientes aquáticos através dos bioensaios (letalidade) com peixes adultos. Até a década de 80, os peixes eram considerados os organismos-teste mais populares devido ao fato de serem os mais estudados no ambiente aquático, além de possuírem maior valor para os homens. No entanto, as águas residuárias lançadas em ecossistemas aquáticos podem causar danos às milhares de espécies que vivem nestes ambientes, até mesmo quando o volume de descarga é relativamente pequeno (BUIKEMA JUNIOR et al., 1982).

Os ensaios de letalidade com peixes são utilizados rotineiramente, envolvendo a exposição destes organismos a substâncias tóxicas em teste por um período de 96 h. Normalmente, os resultados são reportados como a porcentagem de um volume que é letal a 50% dos organismos-teste, por um período de tempo determinado (CL50). Dois tipos de ensaios de toxicidade aguda têm sido utilizados: estático e contínuo. A seleção de um dos dois tipos depende, acima de tudo, dos objetivos do teste, dos recursos disponíveis, das necessidades do organismo em teste e das características do efluente testado. Espécies como truta arco-íris (truta) e fathead minnow tem sido tradicionalmente utilizadas para medir a taxa de crescimento e a letalidade aguda (FARRÉ; BARCELÓ, 2003).

Como já mencionado anteriormente, em 1977, a pedido da ABNT, a CETESB participou de um programa internacional de padronização de métodos de testes de toxicidade com peixes. O organismo utilizado foi o *Brachydanio rerio* (atualmente *Danio rerio*), popularmente conhecido como paulistinha ou peixe zebra. O comitê técnico estabeleceu que

os seguintes agentes tóxicos deveriam ser testados: sulfato de cobre, sulfato de zinco, cloreto de amônio, fenol e DDT comercial. Cada uma das substâncias foi testada cerca de dez vezes através de sistema de fluxo contínuo e, após um ano e meio, os resultados foram enviados à ISO (CETESB, 1978). Os resultados obtidos, nas séries de 10 testes com as substâncias indicadas pelo comitê técnico, com *Danio rerio* foram semelhantes aos dos outros laboratórios que participaram deste programa da ISO.

2.3.5 Ensaios de toxicidade com decompositores: bactérias e fungos

Uma grande variedade de ensaios envolvendo os efeitos inibitórios de agentes tóxicos sobre o crescimento bacteriano tem sido descritos (ALSOP et al. 1980; BITTON; DUTKA, 1986b; FARRÉ; BARCELÓ, 2001; JARDIM et al., 1990; SLABBERT, 1986; TREVORS, 1986;). Segundo Farré e Barceló (2001), o uso de bactérias como espécies-teste para ensaios ecotoxicológicos têm muitas vantagens como, fácil utilização, pequeno período de teste, ausência de problemas éticos, não necessita de grandes quantidades de amostras ou solventes orgânicos.

Os ensaios bacterianos constituem, ao lado dos ensaios bioquímicos, outro grupo de bioensaios empregando sistemas microbianos para avaliação da toxicidade. Este grupo pode ser dividido em duas categorias principais: os ensaios baseados na medida da viabilidade ou crescimento de bactérias ou grupos específicos de bactérias e os ensaios baseados na medida do efeito de substâncias tóxicas sobre determinadas atividades bacterianas (nitrificação, respiração, potencial heterotrófico, entre outros) (CETESB, 1987; FARRÉ; BARCELÓ, 2001).

Existem diversas técnicas disponíveis para a avaliação de respostas tóxicas com fungos e bactérias, muitas são derivadas de aplicações clássicas de procedimentos com bactérias. Essas técnicas possuem uma vantagem geral de serem de simples execução (embora as considerações matemáticas e estatísticas possam ser complexas) e são econômicas em termos de espaço, recursos e tempo (GADD, 1986).

Alsop et al. (1980) descreveram um teste de inibição de crescimento bacteriano para medir o efeito de substâncias tóxicas em bactérias envolvidas em sistemas de tratamento biológico aeróbio. Para avaliar a eficiência do teste que estava propondo, os autores utilizaram formaldeído e formol como substâncias-teste. Foram realizadas seis repetições para cada uma das substâncias testadas. Para o formaldeído a CE50 foi $19 \text{ mg/L} \pm 2,0$ e para o fenol foi 760

mg/l \pm 140. Os resultados indicaram que este tipo de teste é sensível, econômico e uma ferramenta promissora na avaliação da toxicidade de águas residuárias.

Um teste de inibição de crescimento com *Pseudomonas putida*, padronizado pela ISO 10712-1995, também tem sido utilizado para avaliação da toxicidade de águas residuárias e outros compostos (AHTIAINEN, et al., 2002; SEPIC, et al., 2003). O inóculo bacteriano é cultivado em meio adequado e posteriormente adicionado nos recipientes-teste contendo o meio de cultivo e a amostra em teste. Os resultados são expressos como percentual de inibição em relação ao controle.

Um exemplo de bioensaio bacteriano que utiliza uma espécie ecologicamente importante, é realizado com *Nitrobacter* para avaliação da toxicidade de águas residuárias ao sistema de lodos ativados ou filtros biológicos (BITTON; DUTKA, 1986a). O bioensaio é baseado na conversão do NO_2^- a NO_3^- pela suspensão celular de *Nitrobacter*. O decréscimo de NO_2^- , medido em cada período de amostragem é o critério utilizado para avaliar a toxicidade. As concentrações de nitrito podem ser determinadas através de eletrodos ou com espectrofotômetro. A concentração de NO_2^- versus tempo é plotada para cada amostra e a inclinação é determinada através de um teste estatístico. A comparação do coeficiente angular das amostras com o controle, fornece a taxa metabólica para *Nitrobacter* em cada teste. A partir destes dados, a CL50 do 2,4,5-triclorofenol foi calculada como sendo de 3,5 mg/L (TAM; TREVOSRS, 1981). Os autores deste trabalho concluíram que o bioensaio com *Nitrobacter* preenche as necessidades de um bioensaio sensível para águas residuárias de origem industrial e doméstica.

Schmitt et al. (2004) elaboraram um teste de toxicidade crônica a partir da inibição do crescimento de duas cepas de *Saccharomyces cerevisiae*: uma selvagem e outra geneticamente modificada. As substâncias-teste utilizadas nos ensaios foram: Cu^{2+} , Cr^{6+} , Zn^{2+} , CO^{2+} e Cd^{2+} além dos solventes orgânicos e compostos puros: DMSO, MNNG, 4-NQO, MTBE, etanol e 2-AA. Os resultados indicaram que o teste de inibição de crescimento com *S. cerevisiae* foi eficiente para a detecção da toxicidade crônica dos agentes testados.

Outro tipo de ensaio utilizado é a inibição da motilidade de *Spirillum volutans*. Essa bactéria aquática relativamente grande possui uma motilidade característica devido à presença de flagelos polares em cada uma das extremidades. Na presença de substâncias tóxicas em níveis não letais, *Spirillum volutans* perde seu movimento reverso típico, podendo ocorrer a inativação total das bactérias com aumento dos níveis de toxicidade (CETESB, 1987a).

O ensaio de toxicidade aguda com o sistema Microtox também tem sido utilizado com sucesso no monitoramento de efluentes industriais, águas subterrâneas, teste com sedimentos,

resíduos perigosos e na avaliação da eficiência dos processos de biorremediação. O teste de bioluminescência bacteriana utiliza uma suspensão de bactérias luminescentes como organismo-teste sob condições padronizadas. Nas bactérias, muitas vias metabólicas que funcionam na respiração, oxidação fosforilativa, estabilização osmótica e transporte de químicos e prótons para dentro e fora da célula, estão localizados próximos ou na própria membrana plasmática. Certas cepas de bactérias luminescentes divergem 10% da sua energia respiratória em uma via metabólica específica que converge à energia química em luz visível. Esta via está intrinsecamente ligada à respiração e qualquer mudança na respiração celular ou alteração na estrutura das células resulta em uma mudança na respiração com efeitos na taxa de bioluminescência (APHA, 1999).

No ensaio Microtox, a luz produzida pelos microrganismos é medida sob condições padronizadas, os organismos são expostos a amostra por um determinado tempo, a luz produzida por eles é novamente medida. A redução na quantidade de luz emitida após a primeira e a segunda medição é proporcional à toxicidade da amostra em teste (APHA, 1999). As espécies bacterianas comumente empregadas nesse teste são *Vibrio fischeri* e *Photobacterium phosphoreum*.

2.4 Legislação

Além do Decreto Estadual 8.468 de 8 de setembro de 1976 (redação alterada pelo Decreto N. 50.753, de 28 de abril de 2006), que aprova a regulamentação da lei nº 997, de 31 de maio de 1976, que dispõe sobre a prevenção e o controle da poluição do meio ambiente, a Resolução SMA 3, de 22 de fevereiro de 2000, trata dos valores permissíveis de toxicidade para os efluentes. De acordo com essa resolução, os organismos aquáticos de um dado corpo receptor não devem sofrer efeito tóxico por ocasião do lançamento de efluentes. Legislações anteriores a Resolução SMA 3, não abordam o problema da toxicidade dos efluentes de forma direta, de maneira que a necessidade de realização dos bioensaios é mais um parecer técnico do que jurídico.

A Resolução CONAMA nº 357/2005 prevê que eventuais interações entre substâncias especificadas ou não na referida Resolução, não podem causar danos/alterações aos organismos aquáticos, nem restringir os usos previstos. A Resolução também recomenda o acompanhamento de alguns parâmetros e a utilização de indicadores biológicos, sejam eles organismos e/ou comunidades aquáticas para o monitoramento da qualidade dos ambientes

aquáticos. Os ensaios ecotoxicológicos são agora mencionados e indicados para avaliar as interações entre substâncias e a presença de contaminantes não listados na Resolução, mas que podem causar dano aos seres vivos e ao ambiente aquático.

Na resolução CONAMA 357/2005 fica claro que para as águas de classe 1 e 2 é recomendada a ausência de efeito tóxico agudo e crônico, nas águas de classe 3 não deve haver efeito agudo, porém é permitida a verificação de efeito crônico, devido ao fato das águas dessa classe não serem requeridas para usos nobres.

Com esta resolução (CONAMA 357/2005), os órgãos ambientais, sejam federais ou estaduais, ganham suporte legal para requerer das indústrias o monitoramento do potencial de toxicidade dos seus efluentes, antes dos mesmos serem lançados no corpo receptor. No artigo 34 é estabelecido que os efluentes de qualquer fonte poluidora somente poderão ser lançados, direta ou indiretamente, nos corpos d'água desde que obedeçam às condições e padrões previstos no referido artigo.

No que diz respeito aos ensaios ecotoxicológicos, o parágrafo 1º do artigo 34 da Resolução CONAMA 357/2005, determina que *“o efluente não deverá causar ou possuir potencial para causar efeitos tóxicos aos organismos aquáticos no corpo receptor, de acordo com os critérios estabelecidos pelo órgão ambiental competente”*.

Os testes de toxicidade visam exatamente determinar os efeitos deletérios para a comunidade aquática, causados pela emissão de agentes tóxicos, sem a preocupação de identificá-los. Sua utilização como instrumento de controle avalia diretamente a condição de certo tipo de água de atender ou não à sua finalidade preponderante de preservação e proteção das comunidades aquáticas (CETESB, 1992).

2.5 Efluentes das Indústrias de Explosivos

O tema dos explosivos não pode ser encarado somente de um prisma estritamente militar. Embora os explosivos tenham sido utilizados em grandes guerras e destruição de vidas humanas, eles possibilitaram também a execução de grandes obras de engenharia. A mineração de todas as espécies depende do desmonte, assim como do ato simples, de limpar um campo de troncos e matacões antes da aradura. Freios de caminhões são restaurados com rebites que têm um explosivo no espigão, as aeronaves são construídas com esse tipo de arrebite. O uso recente de explosivos submersos para moldar metais oferece uma aplicação crescente e constitui uma técnica de fabricação nova (SHEREVE; BRINKS JUNIOR, 1997).

Há muitos séculos os chineses já conheciam uma mistura explosiva formada por enxofre, carvão e salitre, a pólvora negra, que logo depois de 1300 foi utilizada como propelente de mísseis. A descoberta da nitroglicerina e da nitrocelulose, pouco antes de 1850 e, posteriormente, a invenção da dinamites e da espoleta de fulminato de mercúrio foram eventos que marcaram a era dos alto-explosivos (SHEREVE; BRINKS JUNIOR; 1997).

Um explosivo é um material que, sob influência de choque térmico ou mecânico, decompõem-se rapidamente e espontaneamente com a evolução de grandes quantidades de calor e gás. Os explosivos podem ser divididos em duas grandes categorias: alto e baixos explosivos (USEPA, 1995a).

Os alto-explosivos detonantes ou iniciadores são pouco sensíveis e geralmente utilizados em pequenas quantidades em detonadores e cápsulas de percussão para detonar grandes quantidades de explosivos secundários. Os alto-explosivos detonantes secundários, sobretudo nitratos, nitro compostos e nitraminas são muito menos sensíveis ao choque térmico e mecânico, mas eles explodem com grande violência quando detonados por um explosivo iniciador. O principal alto-explosivo secundário manufaturado para uso comercial e militar é o nitrato de amônio. A essa classe também pertence o 2,4,6-Trinitrotolueno (TNT) e o dinitrotolueno, dentre outros. Os baixo-explosivos ou explosivos deflagrantes compreendem a nitrocelulose, pólvora negra e o algodão-pólvora (SHEREVE; BRINKS JUNIOR, 1997; USEPA, 1995a).

Na manufatura e manipulação de explosivos para estocagem e carregamento são gerados resíduos que acabam indo para estações de tratamento de efluentes ou corpos aquáticos. Durante a fabricação dos explosivos são utilizadas grandes quantidades de águas para remoção de contaminantes e produtos indesejáveis. Os efluentes gerados contém ácidos, isômeros de explosivos, o próprio explosivo em suspensão, compostos que causam coloração nas águas, sólidos em suspensão e dependendo do explosivo em manufatura, elevados teores de nitrogênio e fósforo.

Os compostos nitrosubstituídos são liberados na biosfera quase que exclusivamente por fontes antropogênicas. Muitos compostos são produzidos por combustão incompleta de combustíveis fósseis, outros são usados como intermediários sintéticos, corantes, pesticidas e explosivos (SPAIN, 1995).

Muitos explosivos e os componentes das misturas explosivas apresentam efeitos tóxicos e são impactantes ao meio ambiente. Pode-se detectar toxicidade aguda, crônica e risco de câncer quando há contato prolongado com esses produtos. No meio ambiente, muitos explosivos e resíduos da sua queima podem persistir por longo tempo, outros se decompõem

rapidamente. Essas são as razões pelas quais os trabalhadores das indústrias de explosivos e as pessoas em contato com esses materiais precisam tomar cuidado quando os fabricam, manuseiam ou usam estes produtos. Os problemas com os resíduos no ambiente e os possíveis riscos para o homem, os animais e a natureza precisam ser identificados (STUCKI, 2004).

No passado, a maior preocupação dos sistemas de tratamento municipal e industrial era reduzir o consumo de oxigênio causado pelo lançamento de alguns poluentes. Atualmente, uma das maiores preocupações durante o tratamento das águas residuárias contendo poluentes, é com a sua toxicidade. A quantidade de agentes tóxicos encontrados nos ambientes aquáticos é alarmante e não se conhece exatamente o seu efeito na população (BLUM; SPEECE, 1990). Não se sabe ao certo se esses compostos podem ser removidos nas estações de tratamento convencionais, qual o seu impacto nos sistemas de tratamento biológico e que efeitos eles exercem sobre as espécies aquáticas, quando lançados no ambiente.

2.5.1 Produção de TNT e efluentes gerados

O 2,4,6-Trinitrotolueno (TNT) foi sintetizado primeiramente por Willbrand em 1865 (DAUN et al., 1998) e tem sido extensivamente utilizado como explosivo desde 1902. Ele foi produzido e utilizado extensivamente em explosivos durante a I e a II Guerras Mundiais. Como resultado da sua produção, purificação e carregamento em indústrias de armamentos, eles contaminam o solo, as águas subterrâneas e as águas superficiais, tornando-se assim um problema ambiental (KEITH; TELLIARD, 1979). Pequenas quantidades do TNT podem ser utilizadas em aplicações industriais como composto químico intermediário na manufatura de corantes e componentes fotográficos (TALMAGE et al., 1999).

Dentre os vários tipos de explosivos, o TNT e os seus maiores subprodutos, 2,4-dinitrotolueno (2,4-DNT) e o 2,6-dinitrotolueno (2,6-DNT), são os contaminantes mais importantes em termos de volume e impacto sobre o ambiente aquático (TADROS et al., 2000). Eles fazem parte da lista de poluentes prioritários estabelecida pela Agência de Proteção Ambiental Americana - USEPA (USDHHS, 1995b).

O TNT pode ser igualmente produzido tanto por processo contínuo como por batelada, usando ácido nítrico (HNO_3) e ácido sulfúrico (H_2SO_4) como matérias primas. A produção do TNT pela nitração do tolueno é um processo de 3 estágios realizados em uma série de reatores conforme mostra a Figura 1. O TNT bruto formado durante o terceiro estágio de nitração

consiste primariamente no 2,4,6-TNT. Este produto é lavado à quente para remover o ácido livre gerando assim a água amarela. (USEPA, 1983). Embora em menor escala, uma variedade de subprodutos é formado, como cinzas e resíduos minerais, provenientes dos ácidos sulfúrico e nítrico; 4-5% de isômeros assimétricos 2,3,4 (β); e 2,3,6 (δ); produtos de oxidação lateral como nitrofenóis, ácido trinitrobenzóico e tetranitrometano; produtos de oxidação do benzeno e xileno, os quais normalmente são impurezas encontradas no tolueno (RODRIGUES, 2005).

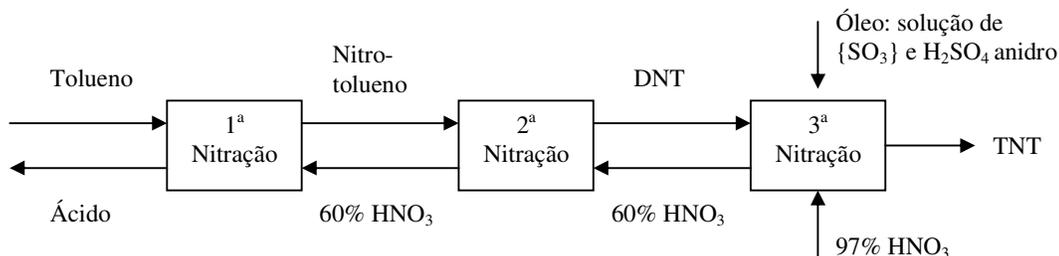


Figura 1 - Processo de produção do TNT em três estágios (USEPA, 1983).

No processo de produção do TNT, um TNT assimétrico (isômero indesejável) é produzido a partir da nitração do tolueno quando este é sulfonado (adição de sulfito de sódio para reagir seletivamente com um nitro grupo na posição meta) no estágio de purificação, para formar vários dinitrotoluenos (DNTs) sulfonados (HAO et al., 1993). Há cinco possíveis isômeros do TNT. O α ou 2,4,6-TNT (isômero) é o produto de interesse militar. Os outros cinco são meta isômeros formados como subprodutos durante a manufatura do TNT. O isômero 2,4,5 é o meta isômero mais abundante (quase o mais abundante de todas as impurezas) no TNT bruto seguido pelo 2,3,4-; 2,3,6- e 3,4,5-isômero (RYON et al., 1984). Esses DNTs sulfonados altamente solúveis são então separados do relativamente insolúvel TNT (produto desejável), resultando na geração da água vermelha (AV). Além do DNT sulfonado, a água vermelha contém muitos produtos conhecidos e desconhecidos, provenientes tanto dos estágios de nitração como da purificação, incluindo os poluentes prioritários 2,4-dinitrotolueno (2,4DNT) e 2,6-dinitrotolueno (2,6DNT). A água vermelha está listada como um resíduo perigoso pela "United States Resource Conservation and Recovery Act (USRCRA)" (k047) baseada na sua reatividade. O seu tratamento e disposição representam um problema para as indústrias produtoras de TNT (HAO et al., 1993). Atualmente esta água vem sendo incinerada devido às escassas opções de tratamento.

Segundo Ryon et al. (1984) a concentração máxima nominal de impurezas presentes no TNT bruto é de aproximadamente 7,53%. Ela é reduzida para 3,24% pela purificação com

sulfito de sódio. Entretanto, desses 3,24% de impurezas, 1% não estava originalmente presente no TNT bruto, mas foi gerado durante o tratamento com sulfito. Os dois principais poluentes gasosos emitidos na manufatura do TNT são o óxido de nitrogênio e (NO_x) e o tetranitrometano. Entretanto, os poluentes aquosos são a maior preocupação na manufatura do TNT.

Em diversos trabalhos foi encontrado o termo “pink water” que pelas suas origens difere da AA e da AV. O efluente denominado “pink water” é resultante da água de lavagem da planta de produção de TNT e outras etapas de limpeza. Inicialmente essa água quase não é colorida, mas assume coloração “pink” quando exposta a luz solar em pH 7 ou superior, devido aos produtos de fotodegradação gerados a partir do TNT, mesmo quando este se encontra em concentrações tão baixas quanto 0,5 ppm (RYON et al. 1984).

2.5.1.1 Toxicidade dos efluentes da produção de TNT

A toxicidade dos compostos nitro aromáticos é de grande importância devido a sua ampla distribuição em munições: o TNT está presente em bombas e granadas, já o DNT é utilizado como um aditivo energético em propelentes. Não somente o contato com as substâncias originais deve ser controlado, mas também as impurezas naturais e os produtos de decomposição, já que todos eles têm alto potencial de toxicidade. Na lista de carcinógenos do U.S. National Institute of Occupational Safety and Health- NIOSH (Instituto Nacional Americano de Saúde e Segurança) os DNTs são notáveis; o TNT apresenta risco de câncer menor e não está na lista. Os DNTs são mais tóxicos para os mamíferos do que o TNT mas, o TNT é um potente tóxico para os peixes. Na Tabela 1 são apresentados alguns dados de toxicidade e carcinogenicidade do TNT e do DNT.

Os efeitos tóxicos do TNT incluem alterações sanguíneas principalmente cianose, metahemoglobinemia e hepatite tóxica. A contaminação é possível por inalação de partículas durante a produção, ingestão por falta de condições de higiene e absorção pela pele (RYON, 1984; STUCKI, 2004).

O TNT é manufaturado pela progressiva nitração do tolueno e o produto desta reação é purificado através de lavagem envolvendo grandes quantidades de água. As águas residuárias deste processo contém muitos metabólitos, bem como, produtos da nitração parcial. Esses resíduos de TNT e/ou misturas da biodegradação são mais tóxicos aos ratos e invertebrados do que cada um dos produtos individualmente (HANSEN; SHANE, 1994).

Tabela 1: Dados de toxicidade e carcinogenicidade do TNT e DNTs

Propriedade	2,4,6-TNT	2,4-DNT	2,6-DNT
DL50 para ratos	800-1300	268-650	177-795
Dose letal, 50% de morte	mg/kg	mg/kg	mg/kg
CL50 para peixes	2,4 mg/L	35,5 mg/L	19,8 mg/L
Concentração letal, 50% de morte	Possível	Possível	Carcinógeno
Classe de carcinógeno (D)	carcinógeno (B2)	carcinógeno (B2)	duvidoso (B1)
TDI = dose tolerável diária por peso (D)	0,05 µg/kg	0,2 µg/kg	0,0002 µg/kg
Fator de equivalência para longo tempo de exposição (TNT=1) (D)	1,0	5,0	150
Limite de exposição permissível (mg/m ³ no ar) US-OSHA	1,5	1,5	1,5

Fonte: (STUCKY, 2004)

Com a substituição do tolueno em três posições pelos nitro grupos para formar o TNT, as reações de redução são favorecidas tanto em mamíferos como em microrganismos de ambientes contaminados. A transformação dos compostos nitrosubstituídos ocorre geralmente pela redução sequencial dos nitro grupos para os amino grupos (KAPLAN; KAPLAN, 1982). A interconversão entre os dois, entretanto, envolve a produção de intermediários que correspondem aos derivados nitroso e hidroxilamino – os quais são reativos e, em muitos momentos, mais tóxicos do que as moléculas originais (FU, 1990) (Figura 2).

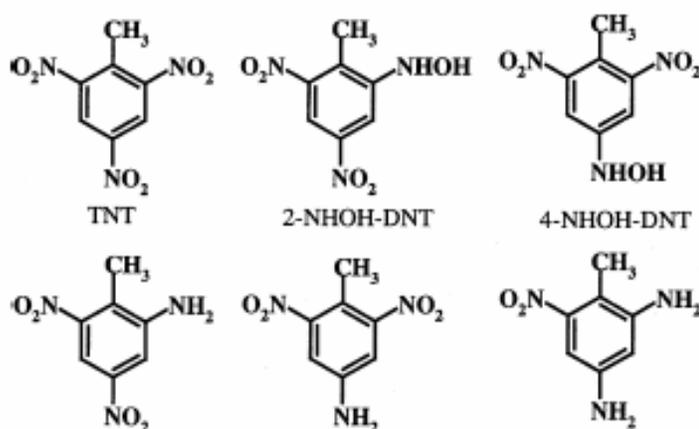


Figura 2 - A fórmula do 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) e seus metabólitos: 2-hidroxilamino-4,6-dinitrotolueno (2-NHOH-DNT), 4-hydroxylamino-2,6-dinitrotolueno (4-NHOH-DNT), 2-amino-4,6-dinitrotolueno (2-NH₂-DNT), 4-amino-2,6-dinitrotolueno (4-NH₂-DNT) e 2,4-diamino-6-nitrotolueno (2,4-(NH₂)₂-DNT) (SARLAUSKAS et al, 2004).

Os produtos da transformação reductiva do TNT incluem 2-amino-4,6 dinitrotolueno (2ADNT), 4-amino-2,6-dinitrotolueno (4ADNT), 2,4-diamino-6-nitrotolueno (2,4DANT), 2,6-diamino-4-nitrotolueno (2,6DANT), conforme mostra a figura 2 (PENNINGTON; BRANNON, 2002). Os compostos nitrosubstituídos policíclicos não são muito tóxicos ou carcinogênicos, mas, podem ser ativados não somente pela redução dos nitro grupos pela microflora intestinal, mas também pelo citocromo P-450 de mamíferos, mediado pela oxidação do anel nitroaromático (FU, 1990).

O aspecto mais importante da poluição ambiental pelo TNT e seus metabólitos são os efeitos tóxicos destes compostos sobre os organismos vivos (ZARIPOV et al., 2002).

Stilwell et al. (1976) avaliaram a comunidade perifítica no entorno de uma indústria de munições e observaram efeitos tóxicos sobre os organismos. No corpo receptor, à jusante do lançamento dos efluentes, houve redução do número de espécies e a composição mudou passando a ser de organismos resistentes à poluição. Parâmetros como biomassa, clorofila a e índice autotrófico evidenciaram essas alterações. Esses efeitos foram causados, em parte, pelo aporte de águas residuárias contendo TNT e isômeros do dinitrotolueno, além de um outro efluente industrial.

Ryon et al. (1984) relataram que a maior fonte de poluição na manufatura do TNT para os corpos receptores é a AV, que contém isômeros do TNT, carbonato, sulfato e sulfito de sódio, além de outros agentes químicos complexos. Os nitroaromáticos presentes na água vermelha são degradados (possivelmente pela formação do complexo Meisenheimer seguido pela perda do grupo NO₂), a menos que haja estabilização pela acidificação.

Honeycutt et al. (1996) realizaram um estudo para avaliar a mutagenicidade e a citotoxicidade *in vitro* do TNT e dos seus produtos de degradação, utilizando células H4IIE e de ovário de hamster Chinês-K1 (CHO), respectivamente. Os resultados para ambas as culturas de células (CL50 de 4 g/mL x 24 µg/mL, com intervalo de 95% de confiança), indicaram que o TNT não precisa ser metabolizado para exibir citotoxicidade. Na avaliação da mutagenicidade com o Teste de Ames, os resultados indicaram que o TNT foi levemente mutagênico à cepa TA98, com e sem ativação metabólica, enquanto que à cepa TA100 não houve mutagenicidade. Para estes autores a falta de concordância nos estudos por eles realizados, com outros relatados na literatura, sugere que o TNT, seus metabólitos 2-ADNT e 4-ADNT, não representam uma séria ameaça genotóxica.

Tadros et al. (2000) avaliaram a toxicidade do TNT; 2,4DNT; 2,6DNT e das hidroxilaminas geradas durante a transformação destes compostos por *Clostridium acetobutylicum*, usando *Selenastrum capricornutum*, uma alga verde de água doce. Os três

referidos compostos podem ser assim classificados em relação à toxicidade: TNT > 2,6DNT > 2,4DNT. Todos os metabólitos do TNT foram menos tóxicos do que o próprio TNT. A toxicidade do TNT e seus produtos de degradação segue: TNT > 2,4DHA6NT > 2HA26DNT > 26DA4NT. Uma exceção a esse perfil de toxicidade foi encontrada para o TNT testado na menor concentração (0,14 mg/L) e 2,4DHA6NT na maior concentração (7~28 mg/L). O 2,4DNT e 2,6DNT apresentaram diferença de toxicidade entre os compostos de origem e seus metabólitos, menos aparentes do que ao TNT. As hidroxilaminas intermediárias são sensivelmente menos tóxicas do que os amino-intermediários e os compostos de origem.

Dodard et al. (1999) compararam a toxicidade do 2,4DNT e 2,6-DNT, e uma seleção de seus respectivos metabólitos, com a do 2,4,6-trinitrotolueno, usando ensaios de toxicidade com *Vibrio fischeri* e *Selenastrum capricornutum*. Os resultados indicaram que o 2,4DNT e o 2,6DNT foram menos tóxicos do que o TNT. A toxicidade do DNT parece ser espécie dependente. 2,6DNT foi mais tóxico para *V.fischeri* do que 2,4DNT. Por outro lado, para *S.capricornutum*, 2,4DNT foi mais tóxico do que 2,6DNT. Tal fato reforça a idéia de que existe uma diferença de sensibilidade entre os organismos utilizados nos bioensaios frente a diferentes compostos e a um mesmo composto.

Won et al. (1976) avaliaram a ação tóxica do TNT e seus compostos degradativos sobre os organismos-teste *Selenastrum capricornutum* (alga unicelular de água doce), *Tigriopus californicus* (copépoda marinho) e *Crassostrea gigas* (larva de ostra). Eles também observaram a mutagenicidade desses compostos expondo mutantes de *Salmonella typhimurium*, que requerem histidina, aos compostos-teste e observaram a reversão desta característica ou seja, bactérias não dependentes da histidina. Os resultados obtidos indicaram não haver toxicidade dos produtos de degradação do TNT aos organismos-teste. No entanto, o próprio TNT mostrou-se tóxico aos organismos: concentrações maiores que 2,5 mg/L suprimiram o crescimento de *Selenastrum capricornutum* e 5 mg/L aumentou a taxa de mortalidade do copépoda e de *C. gigas*. Os ensaios de mutagenicidade com os metabólitos do TNT mostraram que os mesmos não são mutagênicos. No entanto, o TNT em concentrações de 0,5 a 10 µg/mL mostrou ser mutagênico.

A persistência dos explosivos no meio ambiente depende de diversos fatores, incluindo o grau em que eles bioacumulam e do modo como são degradados. No ambiente aquático, os mecanismos que afetam a persistência incluem os processos de degradação física da fotólise e hidrólise assim como a degradação biológica. Estudos sobre a degradação microbiana do TNT indica uma meia vida de 19 a 25 dias após um período de adaptação de 13 a 20 dias. A taxa de

biotransformação do 2,4DNT é muito mais rápida do que a do TNT e indica pouca persistência no ambiente aquático.

2.5.1.2 Fototoxicidade dos efluentes do TNT

Vários poluentes ambientais interagem com a luz solar ultravioleta com agravamento dos seus efeitos tóxicos. O fenômeno da toxicidade mediada pela luz é conhecido como fototoxicidade (DAVEMPORT et. al, 1994). Segundo Burrows et al. (1989), o primeiro mecanismo físico que degrada o TNT em soluções aquosas é a fotólise. A fotólise do 2,4,6-TNT em soluções aquosas é o fenômeno responsável pelo desenvolvimento da chamada “pink-water”, que é provavelmente, o mais importante destino do TNT em sistemas aquáticos (USDHHD, 1995). A chamada “pink-water” é rica em nitrocompostos e contém numerosos produtos de degradação do TNT.

Segundo Burlinson (1980), os maiores produtos de transformação do TNT em águas naturais são: 1,3,5-trinitrobenzeno, 4,6-dinitroantranil, 2,4,6-trinitrobenzaldeído, 2,4,6,6-trinitrobenzonitrila e o ácido 2,4,6-trinitrobenzóico. Além desses, também foram identificados derivados azo e azoxy formados pela ligação dos produtos nitroso e hidroxilamino.

A taxa natural de fotólise do TNT em águas naturais superficiais tem sido muito maior do que em água pura. A fototransformação do TNT em águas naturais ocorre via fotólise direta e indireta. A fotólise direta do composto é rápida: a meia vida estimada varia de 14 a 84 h, dependendo da estação e latitude. Essas taxas são aumentadas em águas naturais através da influência de ácidos húmicos e fotólise indireta. Sob a luz solar, a fotólise do TNT se processa 10-100 vezes mais rápido do que em água destilada, com meia vida de 0.5 h a 22 h em águas naturais. A fototransformação em águas naturais pode ser acelerada devido a complexação do TNT e compostos orgânicos naturais, ou pelo mecanismo indireto pelo qual a luz absorvida pelos constituintes orgânicos naturais é transferida para o TNT, ou pela captura química pelos ácidos húmicos de produtos reativos intermediários da fototransformação (SPANGGORD et al., 1985).

Em estudos de laboratório, utilizando água destilada, a taxa de transformação aumentou com o tempo, desde que a fotólise foi também promovida pela presença de produtos da fotodecomposição no meio (USDHHD, 1995). No entanto, em águas profundas, onde a luz solar é atenuada, o TNT torna-se mais persistente.

Davenport et al. (1994) investigaram a fototoxicidade do TNT e do 2,3-, 2,4-, 2,6-, e 3,4-DNT e DAT, e os dois maiores metabólitos 2ADNT e 4ADNT, usando *Daphnia magna* (toxicidade aguda) e aos embriões de *Lytechinus variagatus* (ouriço do mar) (teste sub agudo, desenvolvimento). Muitos dos compostos foram fracamente tóxicos ou não tóxicos no escuro. Todos foram fototóxicos ao ouriço do mar. Nos testes com *D. magna*, 2,3 e o 3,4-DNT/DTA e o 4ADNT não foram tóxicos mas foram fototóxicos; o 2ADNT foi tóxico e fototóxico, os outros isômeros não foram tóxicos nem fototóxicos para essa espécie. Ainda segundo esses autores, a luz que intensifica o mecanismo de ação tóxica do TNT, 4ADNT e/ou 2ADNT, o que poderia ser explicado pelo dano à membrana celular em resposta aos ânions induzidos pela luz ultravioleta.

Jonhson et al. (1994) compararam a toxicidade do TNT e do aminodinitrotolueno a *D. magna*, *Dugesia dorotocephala* e eritrócitos de ovelha. A planária *D. dorotocephala* metabolizou TNT (1 mg/L) a 4ADNT (0,4 mg/L) e 2ADNT (0,2 mg/L). A co-exposição à luz ultravioleta aumentou a toxicidade do 2ADNT mais do que a do TNT e do 4ADNT. Todos os compostos apresentaram mecanismos de ação tóxica, envolvendo a formação dos conjugados de quinona-glutationa. Os estudos de hemólise, utilizando eritrócitos de ovelha, mostraram que a luz aumenta o mecanismo de ação tóxica do TNT, 2ADNT e/ou 4ADNT, mas não envolvem dano à membrana celular em resposta aos ânions induzidos pela luz ultravioleta.

No estudo realizado por Zeng et al. (2004) foram identificados os principais foto produtos da fototransformação do TNT sintetizada pela riboflavina: 2ADNT, 4ADNT e 3,5-dinitroanilina. Ao estudar o impacto citotóxico desses produtos e do TNT em microrganismos aquáticos, os autores identificaram maior fototoxicidade do TNT do que de seus produtos. Inclusive os fotoprodutos da atrazina e do TNT tornaram-se substratos de crescimento para bactérias em ambientes aquáticos naturais.

Dave et al. (2000) investigaram o efeito da luz ultravioleta (UV) na toxicidade de seis explosivos: ácido pícrico, TNT, 2,4DNT, hexahidro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazina, nitroguanidina e pentil em fase aquosa, utilizando o microcrustáceo *D. magna*. Após as 48h de exposição para determinação da toxicidade aguda, as amostras foram irradiadas com luz UV por 2 h. A indução da fototoxicidade do TNT e um de seus produtos de degradação foi confirmada neste estudo.

Liu et al. (1983) observaram que ao expor as águas residuárias de uma indústria de munições, com TNT (90 mg/L) e uma mistura de TNT-RDX (RDX: hexahidro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazina) à luz ultravioleta (simulação da luz natural), houve redução na sua toxicidade por um fator de até 25. A toxicidade dessas amostras diminuiu à medida que a degradação

fotolítica do TNT aumentou. Os produtos da fototransformação do TNT foram geralmente mais tóxicos do que o TNT, entretanto, há evidências de que na fotólise do TNT, a concentração dos fotoprodutos não alcança níveis letais.

Segundo Talmage et al. (1999) alguns autores observaram que a luz necessária para a realização dos ensaios com plantas em geral, algas e plantas aquáticas, em testes estáticos, resultou na fotólise do TNT.

Liu et al. (1983) ao avaliarem o efeito da fotoirradiação, sob diferentes condições de pH, na toxicidade do TNT e águas residuárias de uma indústria de munições, utilizando o peixe “fathead minnows” (CL50 96 h), observaram que a toxicidade das amostras consideradas foi afetada pelo pH quando fotoirradiadas. No entanto, o efeito é irrelevante.

Os resultados dos estudos comentados até aqui, mostram vários fatos importantes a respeito do risco ambiental que o TNT e seus compostos possuem. Davemport et al. (1994), relataram que a co-exposição do TNT a luz ultravioleta é requerida para a manifestação de todo o seu potencial tóxico. O aumento da toxicidade desses compostos pela luz ultravioleta significa que qualquer avaliação do seu risco ao meio ambiente deve considerar o papel da luz solar. Portanto, diante do problema abordado torna-se ainda mais importante a avaliação da toxicidade dos efluentes da produção do TNT e da eficácia do tratamento desses efluentes para que os mesmos não produzam dano ainda maior no corpo receptor.

2.5.1.3 Produção de nitrocelulose e efluentes gerados

Constituintes estruturais das plantas

A celulose é a base estrutural das células das plantas, ela é uma substância natural importante, é produzida pelos organismos vivos, e possui grande ocorrência quantitativa. A celulose consiste de unidades anidroglicopiranosose associadas entre si, formando polímero linear de glicose mantido por ligações β -(1 \rightarrow 4) (FENGEL; WEGNER, 1984).

A celulose é distribuída em todas as plantas e o seu isolamento é fortemente influenciado pelo acompanhamento de substâncias dentro da parede celular. Compostos como gorduras, ceras, proteínas e pectina podem ser removidos facilmente pela extração com solventes orgânicos e álcalis diluídos. Em madeira, a celulose não só está acompanhada por polioses e lignina, como também está associada a eles, e a separação requer tratamento químico intensivo. Ela é a base de muitos produtos: papel, filmes, fibras, dentre outros (FENGEL; WEGNER, 1984).

Além da celulose, vários polissacarídeos, chamados de polioses ou de hemiceluloses, estão presentes na madeira, assim como em outros tecidos de plantas. Eles são uma mistura de polímeros polissacarídeos de massa molar mais baixa que a celulose, intimamente associados com a celulose da madeira. As hemiceluloses são polímeros também de vários polissacarídeos de cadeias curtas e com maior grau de branqueamento que a celulose (LEWIN, 1991).

A lignina é o principal material que não é carboidrato nas plantas. Lignina é um polímero amorfo, de composição química complexa. É na verdade uma classe de materiais correlatos, pois não possui composição idêntica em todos os vegetais. Substâncias que resultam da degradação da lignina nos processos de obtenção da celulose e papel variam na sua composição e características, de acordo com o tipo de processo. No entanto são, geralmente, de natureza fenólica e de certo modo solúveis na água (CETESB, 1986a).

Nitrocelulose

Há muito tempo foram detectadas as propriedades explosivas do algodão nitrado. A descoberta de métodos de geleificar o material, transformando-o numa massa uniforme e densa, de aparência resinosa, reduziu a superfície e a rapidez da explosão. Com a descoberta de métodos apropriados de estabilização, para prolongar a vida em depósitos, a nitrocelulose logo deslocou a pólvora negra como propelente militar (SHEREVE; BRINKS JUNIOR., 1997).

Nitrocelulose é um éster de celulose do ácido nítrico, usualmente é um polímero sólido fibroso, não é volátil, possui baixa solubilidade e grau de nitração variável. A nitrocelulose é o maior ingrediente de propelentes além de ser utilizada também em munições, lacas, tintas de impressão e filmes decorativos. Ela mantém a cor de mobílias de madeira e bambu, equipamentos atléticos, cosméticos, além de acrescentar brilho aos produtos metálicos e ao couro (CHANG et al., 2000). Em aplicações militares, o pó base de nitrocelulose (NC) é extensivamente utilizado como propelentes em balas, bombas/granadas e projéteis para munições de tubo (KIM et al., 1999).

A nitrocelulose é obtida através da reação de nitração (esterificação) da celulose com uma mistura de ácido nítrico, ácido sulfúrico e água em proporções variadas, conforme o teor de nitrogênio requerido para o produto final (SANTOS, 2001).

A fabricação da nitrocelulose envolve várias etapas. As principais são mostradas no fluxograma da Figura 3 e compreendem a limpeza mecânica e purificação química do línter (polpação alcalina, branqueamento e neutralização da celulose), nitração da celulose branqueada e, por último, a estabilização da nitrocelulose (SANTOS, 2006).

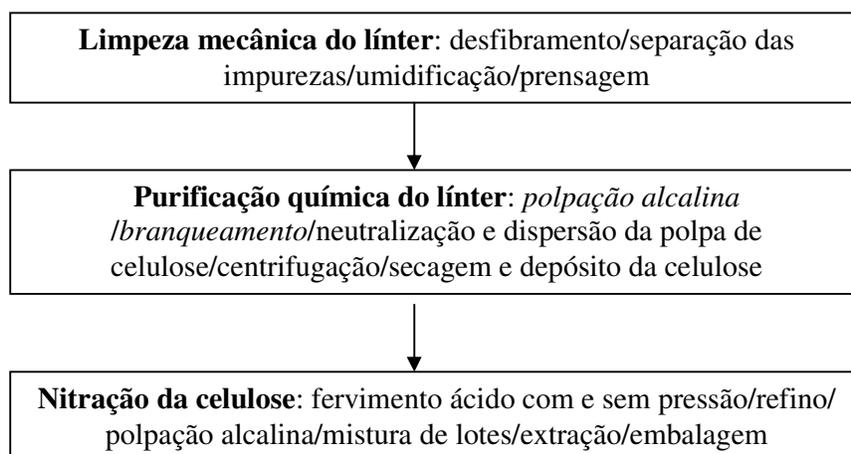


Figura 3 - Fluxograma do processo da fabricação da nitrocelulose (SANTOS, 2006).

Na fábrica de NC que gerou os efluentes estudados, o algodão é utilizado como matéria prima para obtenção da celulose. Ele passa por um equipamento denominado desfibrador para separação mecânica de impurezas como pedaços de sementes, cascas de algodão, corpos metálicos e sílica (SANTOS, 2001).

Após a etapa anterior, o algodão é submetido à deslignificação ou polpação alcalina que visa remover lignina, gorduras e ceras que envolvem a fibra de celulose. Esse processo é responsável pela geração de efluentes com alta Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), cor, sólidos em suspensão e baixas concentrações de oxigênio dissolvido (THOMPSON et al., 2001). O efluente gerado nesta etapa de deslignificação é, portanto, rico em fragmentos de lignina, principalmente compostos fenólicos. Os produtos resultantes, juntamente com os ácidos reinosos e ácidos graxos provenientes dos extrativos, são os principais responsáveis pelas demandas química e bioquímica do oxigênio, toxicidade e elevada coloração desses efluentes (PAIVA et al., 2001).

Após a polpação alcalina, a polpa celulósica é lavada exaustivamente com água, gerando o efluente, que é lançado na estação de tratamento existente na indústria (SANTOS, 2006).

A etapa do branqueamento leva à formação de um grupo de compostos de estrutura diversa, tipicamente organoclorados de baixa e alta massa molar (> 1000 g/mol), oriundos da cloração da lignina residual presente na polpa (FREIRE et al., 2000).

Os efluentes resultantes deste processo contém muitas substâncias orgânicas, principalmente compostos fenólicos clorados, os quais apresentam toxicidade para muitos organismos aquáticos e alta resistência à degradação microbiana em meio aeróbio (FREIRE et al., 2000; THOMPSON et al., 2001).

Como toda reação de esterificação, este processo é uma mudança química reversível, fazendo-se necessária a eliminação de água do meio reacional, evitando assim, que ocorra hidrólise e uma série de reações paralelas com a consequente formação de vários subprodutos (SANTOS, 2001). O esquema geral da nitração é mostrado na Figura 4.

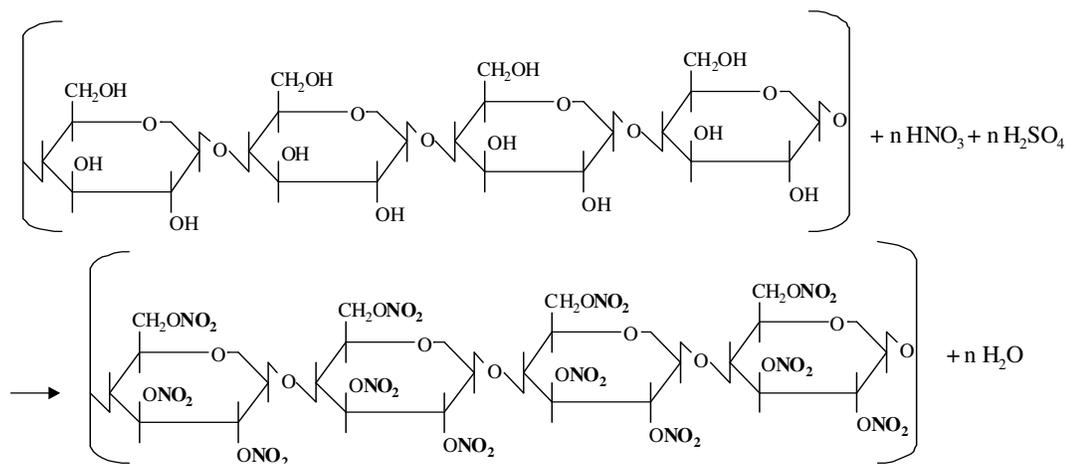


Figura 4 - Processo de nitração da celulose (RODRIGUES, 2005).

Após as etapas já comentadas, a nitrocelulose ainda passa pela estabilização para garantir a possibilidade de manuseio sem que a mesma se decomponha. Nessa etapa, são removidos todos os compostos indesejáveis formados durante a reação de nitração (FRANK, 1955 apud SANTOS, 2001).

Posteriormente a nitrocelulose é submetida ao cozimento ácido sem pressão, para eliminar o excesso de acidez que envolve a fibra; e ao cozimento ácido com pressão para baixar a viscosidade da nitrocelulose e completar o processo de remoção da acidez remanescente. Após os cozimentos com e sem pressão, a nitrocelulose é submetida ao tratamento alcalino a 98°C para eliminar a acidez residual, com uma solução de carbonato de sódio. Na seqüência, para eliminar o excesso de água, a nitrocelulose é submetida ao processo de extração, ficando com aproximadamente 30% de umidade, a qual é, posteriormente, parcialmente substituída por etanol através do processo de alcoolização. Os efluentes gerados na produção de nitrocelulose, exceto o da deslignificação, convergem para os tanques de sedimentação e, destes, para a estação de tratamento de efluentes. A tabela 2 resume as características dos efluentes citados (SANTOS, 2001).

Tabela 2 – Características dos efluentes da produção de nitrocelulose: deslignificação do algodão, branqueamento da polpa do algodão e nitração da celulose.

Variáveis	Efluentes		
	Deslignificação	Branqueamento	Nitração
pH	12,7 ± 0,4	10,4 ± 0,3	0,85 ± 0,02
Concentração de sólidos (g.L ⁻¹)	35,6 ± 0,1	12,66 ± 0,04	9,85 ± 0,1
Compostos inorgânicos (g.L ⁻¹)	15,8 ± 0,6	11,60 ± 0,09	1,46 ± 0,01
Compostos orgânicos (g.L ⁻¹)	19,8 ± 0,5	1,06 ± 0,05	8,39 ± 0,09
Cor verdadeira UC	24.166 ± 80	2,25 ± 0,01	5,05 ± 0,9
COT (mg. L ⁻¹)	20.853	273	105
DQO (mg. L ⁻¹)	23.405 ± 230	nd	74,8 ± 2,3
DBO _{5/20} (mg. L ⁻¹)	5.865 ± 128	nd	12,9 ± 0,8
Concentração de cloro (g.L ⁻¹)		14,2 ± 0,1	
Acidez total H ₂ SO ₄ (%)			1,02 ± 0,01

(SANTOS, 2001) nd = não determinado

Legenda: COT: Carbono Orgânico Total; DQO: Demanda Química de Oxigênio; DBO: Demanda Bioquímica de Oxigênio

2.5.1.4 Toxicidade dos efluentes da produção de nitrocelulose

Devido à escassez de dados sobre a toxicidade dos efluentes da nitrocelulose, e também à similaridade dos efluentes das etapas de fabricação de nitrocelulose, deslignificação e branqueamento, com os da indústria de polpa e papel, que usa o processo soda, exceto pelos efluentes da nitração, a revisão bibliográfica foi realizada em função dos dados de toxicidade apresentados pelos efluentes da indústria de papel e celulose.

Assim como a produção de papel e celulose, a produção de nitrocelulose envolve um elevado consumo de água, consequentemente, são gerados grandes volumes de águas residuárias para tratamento e descarte. Os efluentes produzidos podem causar um considerável dano aos corpos receptores se forem lançados sem tratamento prévio devido a elevada DBO, compostos clorados medidos como compostos orgânicos adsorvíveis (AOX), sólidos suspensos principalmente fibras, ácidos graxos, taninos, ácidos resinosos, ligninas e seus derivados, enxofre e compostos de enxofre. Muitos desses poluentes como taninos, ácidos resinosos, estilbenos e lignina ocorrem naturalmente nas fibras da madeira (ALI; SREEKRISHNAN, 2001) e têm-se atribuído a eles uma fração da toxicidade causada por

esses efluentes. Têm-se reconhecido que uma significativa porção de toda a toxicidade contida nos efluentes da polpação e branqueamento é atribuída a compostos orgânicos não clorados que ocorrem naturalmente nos extrativos da madeira.

Aparentemente, os ácidos resinosos são um importante grupo de poluentes orgânicos em águas residuárias originadas da produção de polpa e papel. Eles são conhecidos por causar efeitos biológicos adversos incluindo letalidade para peixes (CL50 96 h = 0,2-1,7 mg/L), assim como toxicidade crônica, genotoxicidade e potencial de bioacumulação. Quando analisado o perfil dos ácidos resinosos, os ácidos abiético e deidroabiético tendem a predominar, embora apreciáveis quantidades de pimarenos também estejam presentes (LISS et al., 1997).

As práticas relacionadas à eliminação de impurezas orgânicas e inorgânicas nas fibras celulósicas do algodão estão ligadas à geração de compostos organohalogenados medidos como AOX (RIVA; LÓPEZ, 2001). Outros compostos xenobióticos formados durante o processo de polpação e fabricação da madeira são ligninas cloradas, fenóis, dioxinas e furanos. Alguns desses poluentes, notavelmente dibenzodioxinas e dibenzofuranos (dioxinas e furanos), são recalcitrantes a degradação e tendem a persistir na natureza. Eles são conhecidos como poluentes orgânicos persistentes (POPs), sendo classificados como poluentes prioritários pela USEPA (ALI; SREEKRISHNAN, 2001).

Embora tenha sido o primeiro antisséptico usado em ferimentos e cirurgias, fenol é um veneno protoplasmático que danifica as células e supõe-se que tenha causado um extraordinário número de envenenamentos desde que entrou em uso. Os efeitos toxicológicos agudos do fenol ocorrem sobre o sistema nervoso central e a morte pode ocorrer em períodos tão breves como meia hora após a exposição. Nitro grupos (-NO₂) e átomos de halogênios (particularmente Cl), ligados aos anéis aromáticos, afetam fortemente o comportamento químico e toxicológico dos compostos fenólicos (MANAHAN, 2000).

A utilização de cloro ou hipoclorito na etapa de branqueamento da celulose tem causado grandes problemas devido às concentrações residuais dos mesmos nos efluentes gerados dessas etapas. As descargas intermitentes de águas e efluentes clorados nos corpos receptores podem ser perigosos para os organismos aquáticos. Segundo Vetrano (2001), diversos pesquisadores têm relatado que o cloro livre (HOCl ou OCl⁻) é mais tóxico que o cloro residual total e o HOCl é a espécie mais tóxica, sendo que a sua toxicidade é aproximadamente duas a seis vezes maior que a do OCl⁻.

Vetrano (2001) relata que 2 mg/L de cloro residual total tem sido relacionado à morte de peixes. A toxicidade de cloro residual total (CRT) é aparentemente uma função do cloro

residual livre (CRL) em descargas de efluentes. Variáveis ambientais como pH, salinidade e temperatura também exercem o seu papel na toxicidade do cloro aos organismos aquáticos.

Vetrano (2001) demonstrou, através de testes laboratoriais, que sob exposições constantes ao cloro, a biomassa algal foi adversamente afetada em concentrações tão baixas quanto 2 µg/L. A produção de oxigênio e outras medidas de biomassa foram afetadas em concentrações de 0,025 mg/L e 0,025-0,3 mg/L, respectivamente. Em experimentos fechados realizados em campo, esse autor observou decréscimo no número de protozoários em concentrações de 0,079 mg/L, decréscimo da densidade de zooplâncton em 0,024 mg/L e redução de algas e da biomassa total em 0,261 mg/L.

Sponza (2003) investigou a toxicidade aguda das águas residuárias de uma indústria de papel e celulose utilizando bactérias (floc e bactérias coliformes), alga (*Chlorella* sp.), protozoário (*Vorticella* sp) e peixe (*Lepistes* sp.). Os resultados revelaram toxicidade aguda pelo menos a dois organismos em 6 das 20 amostragens. Quanto à sensibilidade dos testes de toxicidade utilizados para os efluentes desta indústria, foi demonstrado que as bactérias, algas e peixes foram os organismos mais sensíveis. O protozoário (*Vorticella* sp.) foi o mais resistente.

Lindström-Seppä et al. (1998) avaliaram a eficiência do tratamento das águas residuárias de uma indústria de papel e celulose que faz branqueamento com cloro, utilizando testes de toxicidade e mutagenicidade. Amostras de águas e sedimentos foram coletadas ao longo das etapas de branqueamento da celulose e tratamento das águas residuárias. Frações extraídas em dietileter foram citotóxicas à cultura de células de hepatoma de peixes. A etapa de tratamento, que compreende a purificação biológica do efluente, não causou redução na citotoxicidade. Após a purificação química e, mais ainda, após as lagoas de aeração, a citotoxicidade foi reduzida. Os mutagenos foram detectados em todas as amostras coletadas após a etapa de cloração.

Paiva et al. (2001), ao avaliarem a toxicidade dos efluentes do processo de fabricação da nitrocelulose, coletaram amostras dos efluentes da polpação, branqueamento e nitração da celulose, e os submetem a testes de toxicidade aguda com a bactéria *E.coli*. Como resultado, observaram que os efluentes da polpação e branqueamento foram altamente tóxicos ao microrganismo testado, causando 100% e 48% de inibição respiratória, respectivamente. Já o efluente proveniente da nitração da celulose não apresentou toxicidade para o organismo utilizado.

2.6 Potencial mutagênico dos efluentes industriais

Uma mutação é uma alteração na seqüência de bases do DNA (TORTORA et al., 2002) que não resulta de segregação ou recombinação (LARINI, 1993). O processo quando não é letal (LAH et al., 2004) para a célula pode propagar-se pelo organismo em crescimento caracterizando uma mutação somática (pele ou órgãos), ou transmitir-se às gerações futuras caracterizando uma mutação germinal (em óvulos ou espermatozóides).

A detecção de atividade mutagênica em misturas complexas, como as amostras ambientais, é muito importante para a saúde dos seres vivos e preservação dos ecossistemas (COELHO, 1995). Quando os mutágenos são detectados nos efluentes industriais, indica que alguns constituintes desses despejos, lançados nos corpos receptores, podem causar um efeito adverso do ponto de vista de Saúde Pública, devido ao potencial de exposição humana através da contaminação das águas de abastecimento, águas recreacionais ou alimentos (CETESB, 1987a). Devido à natureza química e física complexa das emissões industriais, as análises físico-químicas são limitadas na sua habilidade de caracterizar a composição química dessas misturas e permitir a subsequente avaliação química-específica da genotoxicidade ou carcinogenicidade. Além disso, nem sempre os tratamentos são capazes de reduzir a genotoxicidade de um efluente sendo que, em muitos casos, eles podem até mesmo aumentar o seu potencial mutagênico (CLAXTON et al., 1998)

Bioensaios têm sido utilizados para avaliar a genotoxicidade de uma ampla gama de efluentes e resíduos industriais (CLAXTON et al., 1998; LARINI, 1993). Esses ensaios, realizados *in vitro*, são indicados na triagem rotineira dos toxicantes. Os ensaios com microrganismos avaliam basicamente o dano provocado ao DNA pelo toxicante ou pelos seus produtos de biotransformação (LARINI, 1993). Devido ao risco que os efluentes com potencial mutagênico representam para os seres vivos, torna-se de grande importância testar a eficiência dos vários sistemas de tratamento utilizados pelas indústrias, com relação a sua habilidade de eliminar substâncias com potencial mutagênico ou carcinogênico (FRACASSO et al., 1992).

2.7 Justificativa

O Rio Paraíba do Sul é formado pela junção dos rios Paraibuna e Paraitinga, em território paulista, próximo à cidade de Paraibuna. Suas águas drenam uma área de 55.400 Km²,

abrangendo os estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais. A Bacia do rio Paraíba do Sul é de elevada importância estratégica para o Brasil, influenciando as duas maiores cidades do País, São Paulo e Rio de Janeiro. A cidade do Rio de Janeiro depende basicamente de suas águas para o abastecimento público, através da reversão para o sistema Lages-Guandu. Diversos municípios do Vale do Paraíba utilizam suas águas para o abastecimento público e, ao mesmo tempo, como corpo receptor de seus efluentes. O rio também é utilizado como fonte de irrigação na agricultura e para a geração de energia elétrica (CETESB, 1990).

A considerável expansão demográfica, associada a um desenvolvimento industrial intenso e diversificado, vem resultando em problemas de contaminação de origem industrial e doméstica, além do risco por acidentes nas rodovias e ferrovias que margeiam o rio, muitas vezes, por onde são transportados produtos de alta periculosidade. As maiores concentrações industriais ocorrem em Jacareí e São José dos Campos, no estado de São Paulo, e na região de Resende e Volta Redonda, no Estado do Rio de Janeiro. Verifica-se assim, que o Rio Paraíba do Sul apresenta como principal problema, além da contaminação por esgoto doméstico, poluição química causada pelo lançamento de resíduos industriais (CETESB, 1990).

A indústria de explosivos, objeto de estudo neste trabalho, está localizada na Região do Vale do Paraíba, no estado de São Paulo. Dada à importância deste rio, a preocupação com a qualidade das águas de seus afluentes passa a ser de grande relevância, já que os mesmos podem ajudar a deteriorar a sua qualidade.

De acordo com o que foi discutido anteriormente, ao longo da revisão bibliográfica, conclui-se que a utilização de apenas um organismo na realização dos ensaios de toxicidade não é confiável. Um único representante de um nível da cadeia trófica não pode refletir o impacto de uma substância tóxica em todos os seus níveis. Além do mais, há de se considerar as diferenças de sensibilidade entre as espécies do mesmo nível e de níveis tróficos distintos. Outro ponto a ser levado em conta é que os efluentes das indústrias de explosivos possuem compostos tóxicos que agem de maneira diferenciada nos organismos utilizados como indicadores, devido às diferenças fisiológicas que cada um deles naturalmente expressa e ao modo de ação dos compostos. Devido ao fato dos efluentes serem lançados em um rio após um tratamento simplificado pela indústria, foram escolhidos organismos-teste representantes do ambiente de água doce.

O presente trabalho representa uma proposta para minimizar estas diferenças comentadas, a partir de uma avaliação comparativa da sensibilidade dos organismos-teste para os efluentes em estudo. Assim, com a utilização de uma análise integrada de diversificados ensaios com diferentes organismos, aliada com dados ecológicos e químicos, será possível aperfeiçoar e

inovar as metodologias de monitoramento ambiental, obtendo-se uma maior precisão nos diagnósticos dos impactos ambientais causados por contaminantes de origem industrial.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Determinar o potencial tóxico dos efluentes gerados na produção do 2,4,6-Tinitrotolueno (TNT) e da nitrocelulose. A partir dos dados obtidos, comparar e selecionar os organismos-teste mais sensíveis, para compor uma bateria de testes a ser empregada no monitoramento ecotoxicológico de cada um dos efluentes estudados.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar a toxicidade aguda (CE50) e crônica (CENO) dos efluentes gerados na produção da nitrocelulose - deslignificação, branqueamento, nitração e a mistura de todos eles – além dos efluentes gerados na produção do 2,4,6,-trinitrotolueno - água amarela, água vermelha e da mistura de ambas, utilizando *Pseudokirchneriella subcaptata*, *Daphnia similis*, *Danio rerio*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas putida* como organismos-teste para os ensaios ecotoxicológicos.
- Comparar e selecionar por meio de testes estatísticos, os organismos-teste mais sensíveis para futuras determinações de toxicidade nos efluentes estudados.
- Identificar os prováveis elementos que causaram a toxicidade através da determinação de alguns parâmetros físico-químicos nos efluentes como DQO, cor, pH, condutividade, oxigênio dissolvido.

4.0 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Área de estudo

Os efluentes analisados neste trabalho foram originados de uma indústria de explosivos localizada no Vale do Paraíba/SP.

4.1.1 Amostragem

Foram coletadas amostras simples dos seguintes efluentes antes do tratamento:

- a) efluentes gerados nas etapas da produção de nitrocelulose: deslignificação, branqueamento, nitração e a mistura de todos esses efluentes na proporção de 1:1 - proporcional a vazão desses efluentes na indústria.
- b) efluentes oriundos da produção do 2,4,6- trinitrotolueno: água amarela, água vermelha e a mistura de ambos na proporção de 77 e 23%, respectivamente – proporcional a vazão desses efluentes na indústria.

Os efluentes foram coletados manualmente, em volumes individuais de 2 L, separados em alíquotas menores de 300 mL e congelados a -18°C em freezer até o momento de serem utilizados. No total, foram realizadas 12 coletas. Em virtude da validade das amostras para realização dos ensaios ecotoxicológicos, a cada dois meses foi feita uma nova coleta e os efluentes antigos armazenados e posteriormente enviados à indústria que os originou.

Todos os efluentes tiveram o seu pH original ajustado para $7,0 \pm 2,0$, anteriormente à realização das diluições para o preparo das soluções-teste.

De acordo com informações obtidas na indústria, onde os efluentes foram coletados, a vazão dos mesmos é: deslignificação ($420 \text{ m}^3/\text{dia}$), branqueamento ($360 \text{ m}^3/\text{dia}$), nitração ($2600 \text{ m}^3/\text{dia}$), água amarela (1000 L/h) e água vermelha (300 L/h), considerando a fábrica em plena capacidade de produção e a mistura das águas de todas as etapas de lavagem realizadas para cada efluente mencionado.

4.2 Análises ecotoxicológicas

4.2.1 Ensaio de toxicidade crônica com a alga *Pseudokirchneriella subcaptata* (Korshikov) (antigamente *Selenastrum capricornutum*)

O método para determinação da toxicidade crônica com a alga verde *Pseudokirchneriella subcaptata* foi realizado conforme a metodologia NBR 12648/05. Este método permite avaliar os efeitos tóxicos do efluente sobre o crescimento de uma cultura específica de algas, em fase exponencial de crescimento. A cultura foi exposta a pelo menos cinco diferentes concentrações dos efluentes avaliados mais o controle, tudo em triplicata, por 96 h, à temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, intensidade luminosa de 3500 Lux e agitação de 130 rpm. Como recipientes-teste foram utilizados frascos erlenmeyers de 250 mL, contendo um volume final de 100 mL de solução-teste. Para cada efluente foi realizado um ensaio preliminar, para definir as concentrações a serem utilizadas no ensaio definitivo, e o ensaio definitivo para a determinação da CEO, CENO e do VC.

A alga *P. subcaptata* foi adquirida junto à unidade da EMBRAPA de Jaguariúna/SP. O inóculo algal utilizado no ensaio foi preparado adicionando-se 100 μL da cultura algácea mantida em estoque no meio líquido, em 100 mL do meio de cultivo L.C.Oligo Tabela 3, previamente autoclavado (120°C por 15 minutos). O inóculo algal foi iniciado 3 a 7 dias antes do ensaio, sendo mantido em incubação na mesa agitadora nas mesmas condições de temperatura, luminosidade e agitação utilizadas no ensaio. No dia do ensaio, o inóculo, já em fase exponencial de crescimento, foi utilizado para inocular as soluções-teste em um volume compreendido entre 0,1 e 1,0 mL, de forma que a concentração inicial de algas estivesse entre 10^4 células/mL e 10^5 células/mL no volume final de 100 mL das soluções-teste.

O número de células algáceas foi determinado pelo método de contagem celular em câmara de Neubauer sob microscópio óptico. Tanto a preparação dos inóculos como a montagem dos ensaios ocorreu na câmara de fluxo laminar para evitar contaminações.

Os recipientes-teste foram dispostos aleatoriamente na mesa agitadora e suas posições alteradas diariamente, diminuindo assim possíveis interferências espaço-temporais. Antes da montagem dos ensaios, as amostras dos efluentes tiveram seu pH ajustado para a neutralidade $7,0 \pm 2,0$, já que os mesmos não são lançados com o seu pH original no corpo receptor. Os esquemas de preparo das soluções-teste com o meio L.C.Oligo pode ser visto na Tabela 4.

Tabela 3 - Composição do meio L.C.Oligo (NBR 12648/05).

Solução	Reagente	Quantidade mg	Preparo
1	Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	4 000	Dissolver e diluir a 100 mL com água processada
2	KNO ₃	10 000	
3	MgSO ₄ .7H ₂ O	3 000	
4	K ₂ HPO ₄	4 000	
5	CuSO ₄ .5H ₂ O	30	Dissolver e diluir a 1000 mL com água processada
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	60	
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	60	
	CoCl ₂ .6H ₂ O	60	
	Mn(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	60	
	C ₆ H ₈ O ₂ .H ₂ O	60	
6	H ₃ BO ₃	60	Dissolver e diluir a 1000 mL com água processada
	C ₆ H ₅ FeO ₇ .5H ₂ O	1 625	
	FeCl ₃ .6H ₂ O	625	
7	FeSO ₄ .7H ₂ O	625	Dissolver e diluir a 1000 mL com água processada
	NaHCO ₃	15 000	

Tabela 4 - Modo de preparo das soluções-teste com águas e efluentes utilizando o meio L.C.Oligo e amostra enriquecida

Solução-teste %	Volume da amostra enriquecida	Volume do meio de cultura mL	Volume final
100	100	Adição de nutrientes	100
50	50	50	100
25	25	75	100
12,5	12,5	87,5	100
6,2	6,2	93,8	100
3,1	3,1	96,9	100
Controle	-	100	100

A medida do crescimento algáceo final também foi realizada através do método de contagem celular em câmara de Neubauer em microscópio óptico. A densidade algácea foi determinada nos controles no início do ensaio e em todos os recipientes-teste no final do ensaio. As densidades médias produzidas em 96 h foram obtidas pela subtração das densidades finais pelas iniciais. Essas médias foram utilizadas para obtenção da CEO e CENO e cálculo do VC através do programa Toxstat (GULLEY, 1994). Os resultados foram

expressos em porcentagem (%) para os efluentes líquidos e, considerados válidos quando ao término do período de ensaio, o crescimento da densidade algácea média do controle fosse pelo menos 100 vezes superior à densidade inicial, para 96 h de exposição, e o coeficiente de variação da densidade algácea das replicatas do controle, no término do ensaio, for menor ou igual a 20%.

4.2.1.1 Ensaio de sensibilidade com a alga *P. subcaptata*

A avaliação da sensibilidade da cultura algácea de *P. subcaptata* foi feita mensalmente utilizando sulfato de zinco ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) como substância de referência, de acordo com os procedimentos descritos na NBR 12648/05. Foram utilizadas as concentrações-teste de (0,03; 0,06; 0,12; 0,25 e 0,50 mg/L), preparadas com água processada a partir de uma solução-estoque $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,1 g/L. O ensaio foi realizado nas mesmas condições que o ensaio com as amostras. Os resultados foram expressos em Concentração de Inibição (CIp) à 50% dos organismos (mg/L) e calculados conforme o programa ICP (The Inhibition Concentration Program) versão 2.0 (1993).

4.2.2 Determinação da toxicidade aguda com o microcrustáceo *Daphnia similis* Straus, 1820 (Cladocera, Crustacea)

Os ensaios de toxicidade com o microcrustáceo *Daphnia similis* foram realizados conforme a Norma NBR 12713/04. Os exemplares iniciais para o cultivo deste organismo foram obtidos na CETESB, onde são mantidos rotineiramente.

Cultivo e manutenção dos organismos-teste

Os organismos foram cultivados em lotes de até 25 adultos por litro, em recipientes de 1 a 2 L, com luminosidade difusa, fotoperíodo de 16 h de luz e temperatura de $20 \pm 2^{\circ}C$. Para o cultivo dos organismos foi mantida a relação de 25 organismos/L. Os cultivos foram trocados no mínimo duas vezes por semana, as segundas e sextas-feiras. A cada semana novos lotes de cultivo eram iniciados, para garantir a disponibilidade de organismos-teste para o ensaio sendo descartados quando atingiam idade superior a 28 dias.

A água de cultivo foi preparada utilizando-se 60% de água destilada, filtrada em filtro de papel qualitativo 80 g/m² e, 40% de água mineral, posteriormente reconstituída com dureza de 40 a 48 mg CaCO₃/L e pH de 7,0 a 7,2. Para cada miligrama de dureza a ser aumentado foi acrescentado 0,5 mL da solução 1 e 0,25 mL da solução 2, Tabela 5. A água foi aerada para solubilização dos sais e saturação do oxigênio dissolvido pelo menos por 24 h antes da sua utilização. Caso a dureza estivesse acima de 48 mg de CaCO₃/L, era adicionada água processada e, caso a dureza estivesse abaixo da que é recomendada, o lote de água era descartado. Se o pH não estivesse entre 7,0 e 7,2, ele era ajustado com solução de ácido clorídrico (HCl) ou hidróxido de sódio (NaOH).

Tabela 5 - Modo de preparo das soluções da água de cultivo e de diluição (NBR 12713/04).

Solução	Reagente	Quantidade mg	Preparo
1	CaSO ₄ .2H ₂ O	1500	Dissolver e diluir a 1000 mL com água processada
	KCl	200	
2	NaHCO ₃	4800	Dissolver e diluir a 1000 mL com água processada
	MgSO ₄ .7H ₂ O	6100	

Alimentação dos organismos

A alga verde unicelular, *P. subcapitata*, foi utilizada (na quantidade de 10⁵ células por organismo/dia) para alimentação de *D. similis*. O alimento foi fornecido diariamente, evitando deixar os organismos por mais de dois dias consecutivos sem alimentação. Além da alga, forneceu-se um complemento alimentar à base de ração de peixe fermentada (Tetramim®). O cultivo das algas verdes unicelulares foi efetuado conforme a metodologia propostas na NBR 12713/04, utilizando-se o meio L.C.Oligo para cultivo. As culturas foram mantidas entre 25 ± 2^oC, sob iluminação e agitação constantes. A contagem das algas foi realizada em câmara de Neubauer em microscópio óptico. Previamente à contagem, procedeu-se a centrifugação das mesmas, para retirar o excesso de meio de cultura algáceo. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e a alga ressuspensa com água de cultivo de *D. similis*.

Ensaio de toxicidade

Neonatos com 6 a 24 h de vida foram expostos a cinco concentrações dos efluentes estudados mais o controle com água de diluição, por 48 h. Os testes foram realizados em recipientes com capacidade de 30 mL contendo 10 mL de solução-teste, Tabela 6. No ensaio preliminar foram utilizados 10 organismos distribuídos em 2 réplicas e no ensaio definitivo foram utilizados 20 organismos distribuídos em quatro réplicas com 5 organismos em cada. O teste preliminar foi conduzido nas mesmas condições do teste definitivo, exceto pelo tempo de duração que foi de 24 h no ensaio preliminar. Os organismos foram mantidos em câmaras incubadoras com fotoperíodo, sem alimentação, com temperatura variando entre $20 \pm 2^\circ \text{C}$. Após o período de exposição de 48 h, realizou-se a contagem dos organismos imóveis, sendo considerados imóveis aqueles que não conseguiram nadar dentro de um intervalo de 15 segundos, após leve agitação do recipiente. A CE50 foi calculada pelo método Trimmed Spearman – Karber (HAMILTON et al., 1997). Os resultados foram expressos em porcentagem para efluentes líquidos e, considerados válidos, se no término do período de ensaio a porcentagem dos organismos imóveis no controle não excedesse 10%.

Tabela 6 – Modo de preparo das soluções-teste com águas e efluentes para o ensaio com *D. similis*.

Solução-teste %	Volume da amostra	Volume de água de diluição mL	Volume final
100	100	0	100
50	50	50	100
25	25	75	100
12,5	12,5	87,5	100
6,2	6,2	93,8	100
3,1	3,1	96,9	100
Controle	-	100	100

4.2.2.1 Ensaio de sensibilidade com *Daphnia similis*

A avaliação da sensibilidade das culturas de *D. similis* foi feita mensalmente utilizando-se como substância de referência cloreto de sódio (NaCl), de acordo com os procedimentos descritos na NBR 12713/04. As concentrações-teste (1,6; 2,0; 2,3; 2,6 e 3,0 mg/L) foram preparadas com água de cultivo, a partir de uma solução-estoque de NaCl 6,0 g/L em água

destilada. A CE50 48 h foi calculada pelo método Trimmed Spearman-Kärber (HAMILTON et al., 1977), e os resultados expressos em mg/L.

4.2.3 Teste de toxicidade aguda com o peixe *Danio rerio* – sistema estático

Os ensaios de toxicidade aguda com o peixe *D. rerio* foram realizados conforme a norma NBR 15088/04. Os ensaios realizados consistem na exposição de organismos adultos, com comprimento total de 2,0 cm \pm 1,0 cm a diferentes concentrações dos efluentes por um período de 48 h (ensaio estático). O parâmetro considerado para determinação da toxicidade é a letalidade.

Foi realizado um ensaio preliminar para estabelecer um intervalo de soluções-teste a ser utilizado no ensaio definitivo. Foram preparadas diluições da amostra e, para cada uma, no mínimo três organismos-teste por recipiente-teste. Ao final do ensaio, foi determinada a menor solução-teste que causou letalidade a 100% dos organismos e a maior solução-teste na qual não se observa letalidade. O ensaio preliminar foi conduzido nas mesmas condições do ensaio definitivo. O tempo de exposição foi de 24 h. No ensaio definitivo foi preparado um controle contendo somente água de diluição e os organismos-teste, além de cinco concentrações-teste. Para cada diluição e controle foram adicionados 10 organismos divididos em 3 replicatas respeitando a relação de 1,0 g de peixe/L de água. Os organismos foram transferidos para o recipiente-teste de forma aleatória e o ensaio conduzido sem alimentação, à temperatura de 23 a 27 °C em sala climatizada, com fotoperíodo de 16 h de luz e 8 h de escuridão. A letalidade foi registrada a cada 24 h até o final do ensaio. Ao final do ensaio, foi calculada a porcentagem de letalidade para cada concentração em relação ao número total de organismos utilizados. O resultado foi expresso como CL50 em porcentagem. Os resultados foram considerados válidos se, no término do período de ensaio, a porcentagem dos organismos mortos no controle não excedia 10%. Para análise dos resultados foi utilizado o programa estatístico Trimmed Spearman-Kärber (HAMILTON et al., 1997).

Para as diluições foi utilizada água destilada reconstituída com pH entre 7,2 e 7,6, teor de oxigênio dissolvido acima de 5 mg/l e dureza entre 40 e 48 mg/L de CaCO₃. Os organismos foram adquiridos em uma casa de aquarismo e aclimatados no laboratório à água de diluição, substituindo-se 25% do volume de água a cada 24 h. Após a substituição total da água, os organismos foram mantidos neste meio no mínimo sete dias antes do início do ensaio em aquários de vidro para aclimação.

4.2.3.1 Teste de sensibilidade com *Danio rerio*

Para avaliação da sensibilidade dos lotes de *D. rerio* foi utilizado o cloreto de potássio (KCl) como substância de referência. Os organismos foram expostos às concentrações (600; 800; 1000; 1200; 1400 mg/L) dessa substância, por um período de 24 h sem fornecimento de alimento, com fotoperíodo de 16 h de luz e temperatura variando entre 23 e 27°C. Após o término do experimento, foi observada a letalidade em cada concentração e calculada a CL50 48 h, assim como seu intervalo de confiança, pelo método estatístico Trimmed Spearman-Kärber (HAMILTON et al., 1977), e os resultados expressos em mg/L

4.2.4 Teste de inibição de crescimento bacteriano com *Escherichia coli* e *Pseudomonas putida*

O teste de inibição do crescimento bacteriano usando as bactérias *E. coli* e *P. putida* foi desenvolvido segundo a metodologia proposta por Slabbert (1986). A bactéria *E. coli* foi obtida a partir de cultivos preexistentes no Laboratório de Tratamento de Efluentes e Meio Ambiente –DEBIQ – EEL. Já o outro microrganismo foi adquirido junto à Coleção de Culturas Bacterianas da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Ambas as bactérias foram armazenadas em placas de Petri contendo Ágar Nutriente a temperatura de 7 a 10°C e repicadas a cada 30 dias.

O teste foi conduzido em erlenmeyers de 125 mL contendo 4 mL do meio Caldo Nutriente na concentração de 40 g/L, 1 mL do inóculo bacteriano (crescido durante à noite até a densidade óptica de 0.8), água de diluição (água destilada) e amostra (efluentes). As amostras foram adicionadas em volumes variáveis conforme a diluição desejada, sendo que o volume máximo de amostra utilizado nesse teste foi de 35 mL correspondendo à concentração de 87,5%, Tabela 7. Todo o procedimento foi realizado com meios e demais utensílios esterilizados em autoclave e manipulados em cabine de fluxo laminar.

Os recipientes-teste foram incubados a temperatura de 37°C para o teste com *E. coli* e 26°C para *P. putida*. Em ambos os testes, o período de incubação do inóculo, estático, foi de aproximadamente 16 h e a duração dos testes, 6 h em shaker com agitação de 120 rpm

Tabela 7 - Esquema da adição das soluções e diluições do experimento

Diluição do efluente %	Volume de amostra mL	Meio Caldo Nutriente mL	Água de diluição mL	Inóculo bacteriano mL	Volume final mL
87,5	35	4,0	-	1	40
73	29,2	4,0	5,8	1	40
50	20	4,0	15	1	40
25	10	4,0	25	1	40
12,5	5	4,0	30	1	40
Controle	-	4,0	35	1	40

Após o período de incubação, realizaram-se as leituras de absorvância em um espectrofotômetro UV/visível U-2000 Hitachi em 600 nm. Os resultados foram expressos como porcentagem de inibição em relação ao controle e CE50 (6 h). A porcentagem de inibição em relação ao controle foi calculada pela seguinte equação:

$$\frac{\text{Densidade óptica do controle} - \text{D. O. da concentração-teste} \times 100}{\text{Densidade óptica do controle}} = \% \text{ inibição} \quad (\text{Equação 1})$$

4.2.4.1 Teste de sensibilidade com a bactéria *E.coli*

Para avaliação da sensibilidade da bactéria *E. coli* foi utilizado como substância de referência o sulfato de cobre (CuSO₄). As concentrações-teste (300; 273; 250; 225 e 212 mg/L) foram preparadas com água processada a partir de uma solução-estoque 5,0 g/L de CuSO₄. Este ensaio foi realizado nas mesmas condições do ensaio definitivo. Os testes foram feitos mensalmente e os resultados expressos como CE50 (6 h) em mg/L e calculados pelo programa ICP versão 2.0 (1993).

4.2.4.2 Teste de sensibilidade com a bactéria *P. putida*

Para avaliação da sensibilidade da bactéria *P. putida* foi utilizada como substância de referência o sulfato de cobre (CuSO₄). As concentrações-teste (200; 173; 160; 150 e 125 mg/L) foram preparadas com água processada a partir de uma solução-estoque 5,0 g/L de

CuSO₄. Este ensaio foi realizado nas mesmas condições do ensaio definitivo. Os testes foram feitos mensalmente e os resultados expressos como CE50 (6 h) em mg/L e calculados conforme o programa ICP versão 2.0 (1993).

4.3 Análises físico-químicas

4.3.1 pH, condutividade, sólidos totais dissolvidos e oxigênio dissolvido

As medidas de pH, condutividade, sólidos totais dissolvidos e oxigênio dissolvido foram feitas em laboratório, após coleta dos efluentes e antes/após realização dos ensaios com as amostras-teste. Os aparelhos foram calibrados semanalmente com soluções próprias recomendadas pelos fabricantes, os procedimentos seguidos estavam de acordo com APHA (1999). O pH dos efluentes foi determinado através da leitura direta em pHmetro, modelo Marte MB-10. A condutividade foi medida utilizando-se o aparelho Tecnopon modelo μ CA-150. Os sólidos totais dissolvidos foram medidos através do aparelho Hanna Instruments Portable pH/EC/TDS/temperature meter modelo HI991300. Os teores de oxigênio dissolvido foram medidos com aparelho Instrutherm modelo MO-880.

4.3.2 Cor

A cor foi determinada de acordo com o método padrão CPPA (1975). Em todas as determinações, as amostras foram previamente centrifugadas por 15 min. a 3500 rpm e o pH ajustado para 7,6 com tampão fosfato 0,1 mol.l⁻¹. A absorbância da solução no espectro visível foi determinada em 465 nm contra água destilada, em um equipamento UV/visível U-2000 Hitachi.

Cálculo:

$$UC = \frac{500 \times A1}{A2} \quad (\text{Equação 2})$$

Onde: A1 = é a absorbância de uma solução padrão de platina-cobalto de 500 UC (A₄₆₅ = 0,132).

4.3.3 Demanda química de oxigênio (DQO)

A análise da DQO baseia-se na oxidação química da matéria orgânica por dicromato de potássio, a temperaturas elevadas e em meio ácido contendo catalisador. As determinações foram feitas de acordo com o procedimento padrão APHA (1999).

Em ampolas de vidro (volume de 20 mL; diâmetro 2,3 cm) foram adicionados 2,5 mL de amostra, 1,5 mL de solução digestora (preparada com 10,12 g de dicromato de potássio; 33,3 g de sulfato de mercúrio II; 167 mL de H₂SO₄, completados para 1000 mL com água destilada) e 3,5 mL de solução catalítica (preparada na proporção de 5,5 g de AgSO₄/kg de H₂SO₄ concentrado). Em seguida, as ampolas foram seladas com maçarico e acondicionadas em estufa a 150°C por 2 h. Após esfriar, as ampolas foram abertas, transferiu-se cerca de 2 mL do conteúdo destas para uma cubeta de vidro e foi realizada leitura de absorvância, no comprimento de onda de 600 nm, em um espectrofotômetro GBC CINTRA20. A demanda química de oxigênio (DQO) da amostra, expressa em mgO₂.L⁻¹ (massa de oxigênio consumido por litro de amostra), foi obtida pela interpolação dos dados obtidos de uma curva de calibração que utilizou biftalato de potássio como padrão.

4.3.4 Dureza

As análises de dureza foram realizadas pelo método de complexiometria, conforme APHA (1999). Para a determinação desse parâmetro foram previamente preparadas, algumas outras soluções.

Solução tampão: dissolveu-se 16,9 g de NH₄Cl em 143 mL de NH₄OH; em seguida, pesou-se 1,179 g de EDTA e 780 mg de MgSO₄.7H₂O ou 644 mg de MgCl₂.6H₂O e dissolveu-se em 50 mL de H₂O destilada. Adicionou-se sob agitação a solução 2 na solução 1 e completou-se o volume para 250 mL com água destilada.

Solução de EDTA: 3,723 g de EDTA e 1000 mL de água destilada. Em seguida fez-se a padronização do EDTA e o cálculo do fator.

Para a determinação da dureza propriamente, adicionou-se 50 mL da amostra em um erlenmeyer de 125 mL, 1 mL da solução tampão e o indicador negro de ericromo. Depois titulou-se com EDTA até o ponto de viragem para o azul e calculou-se a dureza (mg/L de CaCO₃) de acordo com a equação abaixo:

$$\frac{\text{Dureza} = \text{vol. de EDTA (mL)} \times 1000 \times \text{fator (F)}}{\text{vol. amostra}} \quad (\text{Equação } 3)$$

4.4 Tratamento estatístico dos dados

Os resultados dos testes de toxicidade crônica com a alga *P. subcaptata* foram submetidos a vários testes estatísticos que compõem o Programa Toxstat 3.4 (GULLEY, 1995), sendo eles, análise de normalidade dos dados (teste de Chi-quadrado) e homogeneidade das variâncias (teste de Bartlett). Quando verificado que os dados apresentavam distribuição normal, estes foram analisados através do teste de Dunnett, o qual compara cada tratamento com o controle experimental. Porém, quando não verificada a normalidade dos dados e homogeneidade das variâncias, foi aplicado o teste Many-One de Steel (semelhante ao de Dunnett). Em caso de experimentos que apresentaram número desigual de réplicas foi utilizado o método de Benferroni que é semelhante ao de Dunnett. Após seguir o procedimento descrito acima, pelo do teste de Dunnett, identificou-se a menor concentração que causou efeito significativamente diferente do controle CEO (concentração de efeito observado) e a maior concentração que não causou nenhum efeito em relação ao controle CENO (concentração de efeito não observado). A partir destes dados foi calculado o VC em porcentagem para as amostras dos efluentes.

Para avaliação dos resultados de toxicidade aguda com *P. putida* e *E.coli* utilizou-se o programa ICP (USEPA, 1993) para determinação da concentração de inibição a 50% dos organismos. Na determinação da CE50 e CL50 para *Daphnia* e *D. rerio* foi utilizado o programa estatístico Trimmed Spearman-Kärber (HAMILTON et al., 1977).

Para a elaboração da carta-controle de sensibilidade dos organismos com dados obtidos ao longo do período amostral, utilizou-se o programa Microcal Origin 5.0, onde foram plotados os valores de CE50 e CL50 com a média obtida para cada organismo-teste ± 2 desvios.

Na comparação de sensibilidade dos organismos foi utilizado o tratamento estatístico mais adequado para os dados obtidos conforme referências (BARROS NETO et al., 2007; USEPA, 1985; ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006) que leva em consideração os limites de confiança obtidos para os valores de CE50 ou CL50 que se quer comparar segundo a equação 3:

$$G = (\log (UL_{(1)} \div CE50_{(1)}))^2 + (\log (UL_{(2)} \div CE50_{(2)}))^2 \quad (\text{Equação 4})$$

Onde:

UL₍₁₎ = intervalo de confiança superior para o teste 1

UL₍₂₎ = intervalo de confiança superior para o teste 2

CE50₍₁₎ = Concentração efetiva para o teste 1

CE50₍₂₎ = Concentração efetiva para o teste 2

E então, o cálculo:

$$H = 10^G \quad (\text{Equação 5})$$

$$Z = CE50 \text{ maior} \div CE50 \text{ menor} \quad (\text{Equação 6})$$

Se $Z > H$: há diferença significativa entre os valores de CE50

4.5 Síntese dos aspectos metodológicos

Na Tabela 8 pode ser visto uma síntese das metodologias utilizadas no presente trabalho para os ensaios ecotoxicológicos utilizados na avaliação dos efluentes da produção do TNT e nitrocelulose.

Tabela 8 – Síntese dos principais aspectos metodológicos utilizados nos ensaios de toxicidade

Organismo	Toxicidade A=aguda C=crônica	Nº de organismos por teste ou concentração	Nº de réplicas	Temperatura	Duração
<i>P. subcaptata</i>	C	10 ⁴ - 10 ⁵ céls/mL	3	25 ± 2°C	96 h
<i>D. similis</i>	A	20 organismos	4	20 ± 2°C	48 h
<i>D. rerio</i>	A	10 organismos	3	25 ± 2°C	48 h
<i>E. coli</i>	A	1,5 x 10 ⁸ UFC*	3	37 °C	6 h
<i>P. putida</i>	A	1,5 x 10 ⁸ UFC*	3	26 °C	6 h

* UFC: Unidades Formadoras de Colônias

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Controle de qualidade dos organismos-teste

O controle de sensibilidade dos organismos, através da realização periódica de ensaios com determinadas substâncias de referência, é um procedimento que permite maior precisão e confiabilidade nos resultados obtidos, ao longo do tempo, por um mesmo laboratório ou entre laboratórios (ARAGÃO; ARAÚJO, 2006).

A carta controle é uma ferramenta de registro que contempla as respostas dos ensaios de sensibilidade, para estabelecer os intervalos aceitáveis de variação da resposta dos organismos-teste a uma substância de referência, com margem de confiança de 95%. A carta controle é gerada a partir dos resultados de provas sucessivas à substância de referência selecionada, para a qual se obtém o valor da concentração de efeito médio (CL50, CE50 ou CIp). Inicialmente ela pode ser construída com um mínimo de cinco resultados e posteriormente deve-se continuar a realizar os ensaios, para acrescentar mensalmente novos valores até completar uma série de vinte resultados (BAEZ et al., 2004). No presente estudo, os ensaios de sensibilidade foram realizados paralelamente ao período em que se utilizaram os organismos para ensaios com os efluentes. Posteriormente, deu-se continuidade a elaboração da carta-controle no laboratório de Ecotoxicologia do Debiq – EEL.

5.1.1 Teste de sensibilidade com *Pseudokirchneriella subcaptata*

Na avaliação da sensibilidade das culturas algais de *P. subcaptata*, os resultados foram expressos em Concentração de Inibição (CIp) a 50% dos organismos e calculados com o programa computacional ICP. A carta-controle da sensibilidade dos organismos-teste à substância de referência, no período em que foram realizados os testes, está apresentada na Figura 5, com a média acumulada e o limite superior e o inferior do intervalo de confiança.

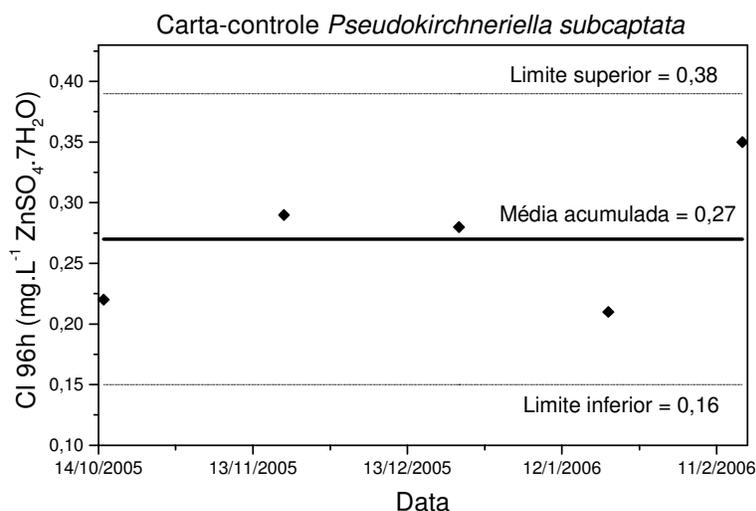


Figura 5 – Carta-controle da sensibilidade da alga *P. subcaptata* ao $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ mg.L^{-1} , no período de outubro de 2005 a fevereiro de 2006, contendo média acumulada de valores e limites superior e inferior do intervalo de confiança.

Na Tabela 9 pode-se observar a concentração de inibição obtida mensalmente, a concentração de inibição média, o desvio padrão desses valores mensais e o coeficiente de variação (CV) dos dados. De acordo com Environment Canadá, um método ecotoxicológico é considerado bom quando a variação dos resultados, expressa pelo CV, for $\leq 30\%$, (ZAGATTO, 2006). Portanto, pode-se dizer que os resultados apresentados na Tabela 9 possuem baixa variabilidade, pois o CV foi menor que 30%.

Tabela 9 – Dados mensais de concentração de inibição (CI) 96 h, intervalo de confiança (IC), desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV), obtidos na avaliação de sensibilidade da alga *P. subcaptata*, utilizando $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ mg.L^{-1} como substância de referência.

Data	CI 96 h (mg.L^{-1})	IC (95%)	Média	DP	CV
10/2005	0,22	0,20 – 0,24			
11/2005	0,29	0,09 -0,33			
12/2005	0,28	0,08 – 0,33			
01/2006	0,21	0,16 – 0,30			
02/2006	0,35	0,29 – 0,36			
-	-	-	0,27	0,06	21,11

5.1.2 Teste de sensibilidade com *E. coli* e *P. putida*

Para avaliar a sensibilidade das culturas bacterianas de *E. coli* e *P. putida*, foi utilizada a substância de referência $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, de acordo com a metodologia proposta por Slabbert (1986). Inicialmente, os testes foram realizados semanalmente para a determinação da faixa de sensibilidade de ambos os microrganismos. Posteriormente, os ensaios passaram a ser feitos mensalmente. Os resultados foram expressos em CE50 6 h e calculados com o programa computacional ICP. As cartas-controle da sensibilidade dos organismos-teste à substância de referência, no período em que foram realizados os ensaios, estão apresentadas nas Figuras 6 e 7, com os valores da média acumulada, limite superior e inferior do intervalo de confiança.

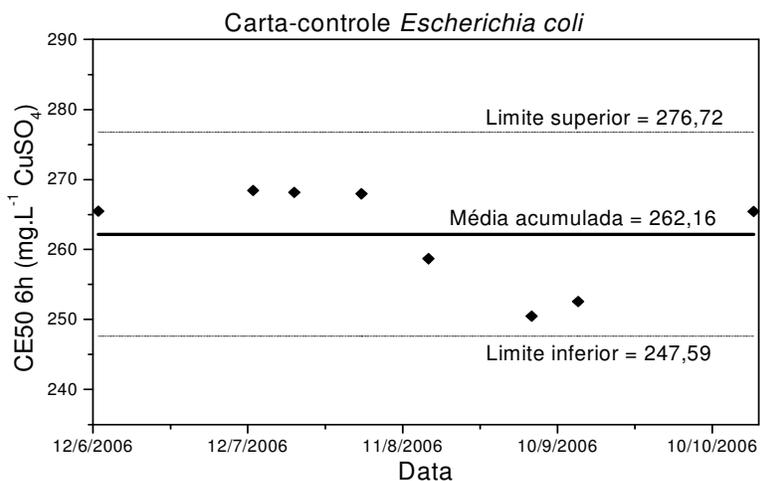


Figura 6 – Carta-controle da sensibilidade de *E.coli* ao $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ mg.L^{-1} contendo média acumulada de valores e limites superior e inferior do intervalo de confiança, ensaios realizados de junho a outubro de 2006.

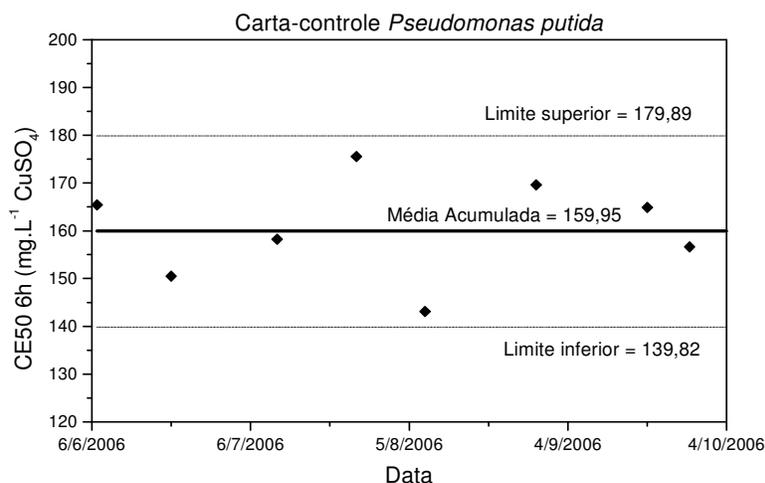


Figura 7 - Carta-controle da sensibilidade de *P. putida* ao $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ mg.L^{-1} , contendo média acumulada de valores e limites superior e inferior do intervalo de confiança, ensaios realizados de junho a outubro de 2006.

Nas Tabelas 10 e 11 pode-se observar as Concentrações de Inibição (CIp) obtidas mensalmente, a concentração de inibição média, o desvio padrão desses valores mensais e o CV dos dados. O CV foi menor que 30% para ambas, indicando baixa variabilidade dos resultados.

Tabela 10 – Dados mensais de CE50 48 h, intervalo de confiança (IC), desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV), obtidos na avaliação de sensibilidade da bactéria *E. coli*, utilizando $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ mg.L^{-1} como substância de referência.

Data	CE50 48 h (mg.L^{-1})	IC (95%)	Média	DP	CV
06/2006	265,5	263,06 - 267,29			
07/2006	268,44	265,10 - 272,93			
07/2006	268,16	265,91 - 270,11			
08/2006	267,95	266,61 - 269,90			
08/2006	258,70	256,70 - 260,17			
09/2006	250,47	246,33 - 253,53			
09/2006	265,44	263,53 - 267,01			
10/2006	252,58	251,76 - 253,75			
		-	262,16	7,28	2,78

Tabela 11 – Dados mensais de CE50 48 h, intervalo de confiança (IC), desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV), obtidos na avaliação de sensibilidade da bactéria *P. putida*, utilizando $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ como substância de referência.

Data	CE50 48 h ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	IC (95%)	Média	DP	CV
06/2006	165,4	163,38 – 167,42			
06/2006	150,53	146,42 – 157,26			
07/2006	158,21	156,84 – 161,01			
07/2006	175,54	173,72 – 177,38			
08/2006	143,11	140,75 – 146,52			
08/2006	169,62	166,15 – 173,36			
09/2006	164,91	164,09 – 165,59			
09/2006	155,76	153,12 – 158,51			
10/2007	155,6	154,80 – 156,71	159,95	9,97	2,84

Schimitz et al. (1998) realizaram ensaios de inibição de crescimento utilizando *P. putida* e *Vibrio fischeri* para avaliar diversos metais pesados, dentre eles, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, mesma substância utilizada para avaliação da sensibilidade da *P. putida* no presente trabalho. A CE50 48 h obtida para *P. putida* foi de 0,3 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Segundo os dados obtidos, os autores concluíram que *P. putida* foi altamente sensível.

5.1.3 Teste de sensibilidade com *D. similis*

A avaliação da sensibilidade de *D. similis* foi feita mensalmente utilizando-se como substância de referência o NaCl. Os procedimentos foram realizados conforme descrito na Norma NBR 12713/05 para *D. similis*. Os resultados foram expressos em CE50 48 h e calculados conforme o programa Trimmed Spearman-Kärber (HAMILTON, 1977). A carta-controle da sensibilidade de *D. similis* à substância de referência no período em que foram realizados os testes, é apresentada na Figura 8 com a média acumulada, limite superior e inferior do intervalo de confiança.

Na Tabela 12 observa-se a CE50 48 h obtida mensalmente, o desvio padrão desses valores o intervalo de confiança e o CV dos dados. O CV foi menor que 30%, o que indica baixa variabilidade dos resultados.

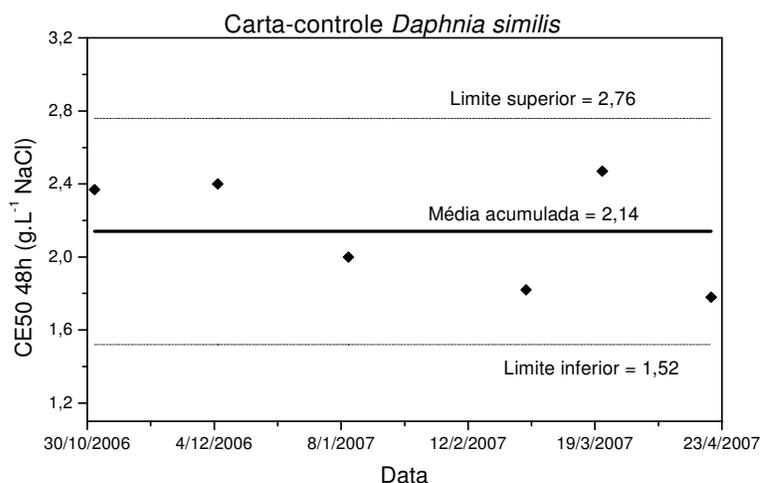


Figura 8 - Carta-controle da sensibilidade de *D. similis* ao NaCl g.L⁻¹ contendo média acumulada de valores, limites superior e inferior do intervalo de confiança.

Tabela 12 – Dados mensais de CE50 48 h, intervalo de confiança (IC), desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV), obtidos na avaliação de sensibilidade de *D. similis*, utilizando NaCl g.L⁻¹ como substância de referência.

Data	CE50 48 h (g.L ⁻¹)	IC (95%)	Média	DP	CV
11/06	2,37	1,62 - 2,47			
12/06	2,40	2,30 – 2,50			
01/07	2,0	2,19 – 2,57			
02/07	1,82	2,08 – 2,36			
03/07	2,47	2,34 – 2,60			
04/07	1,78	1,52 - 2,09			
			2,14	0,31	14,49

5.1.4 Teste de sensibilidade com *D. rerio*

A avaliação da sensibilidade do peixe *D. rerio* foi feita nos três lotes adquiridos a partir de uma casa de aquarismo, utilizando-se como substância de referência o KCl. Os procedimentos foram realizados conforme descrito na Norma NBR 15088/04. Os resultados foram calculados conforme o programa Trimmed Spearman-Kärber (HAMILTON, 1977) e expressos em CL50 48 h. Devido haver somente três valores de CL50, não foi plotada a carta-controle, no entanto,

na Tabela 13 podem ser vistos os valores obtidos de CL50 com seus respectivos intervalos de confiança, média, desvio padrão e coeficiente de variação.

Tabela 13 – Dados mensais de CL50 48 h, intervalo de confiança (IC), desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV), obtidos na avaliação de sensibilidade de *D. rerio*, utilizando KCl g.L⁻¹ como substância de referência.

Data	CL50 mg/L	Média	DP	CV
08 a 10/05/07	894			
29 a 31/05/07	860			
26 a 28/06/07	1.134,62			
		962,87	149,71	0,16

5.1.5 Conclusão dos ensaios de sensibilidade

Assim como em outros processos analíticos, as substâncias de referência são utilizadas para estabelecer a faixa de aceitação de resultados de sensibilidade dos organismos para uso em testes. Além disso, devem ser utilizadas para avaliar, conjuntamente, as condições nas quais o teste foi executado e a sensibilidade do lote de organismos utilizados no mesmo (ZAGATTO, 2006).

De maneira geral, os resultados obtidos na avaliação da sensibilidade dos organismos utilizados no presente trabalho, foram satisfatórios. Um resumo dos resultados obtidos pode ser visto na Tabela 14.

Tabela 14 – Resumo das condições dos ensaios de sensibilidade com média acumulada e coeficiente de variação para cada organismo/substância de referência utilizadas.

Organismos	Subst. de Referência	Duração	Média acumulada	CV
<i>P. subcaptata</i>	ZnSO ₄ .7H ₂ O	96 h	0,27 mg/L	21,11
<i>E. coli</i>	CuSO ₄ .7H ₂ O	6 h	262,16 mg/L	2,78
<i>P. putida</i>	CuSO ₄ .7H ₂ O	6 h	159,95 mg/L	2,84
<i>D. similis</i>	NaCl	48 h	2,14 g/L	14,49
<i>D. rerio</i>	KCl	48 h	962,87	0,16

CV: coeficiente de variação

5.2 Parâmetros físico-químicos monitorados nos efluentes brutos

Os resultados do monitoramento dos parâmetros pH, condutividade, sólidos totais dissolvidos, oxigênio dissolvido e cor para os efluentes da produção de TNT e nitrocelulose são apresentados na Tabela 15.

Tabela 15: Resultado das análises físico-químicas dos efluentes da produção do TNT e nitrocelulose, valores médios das várias amostras coletadas ao longo do estudo.

	pH	Condutividade ($\mu\text{S/cm}$)	STD (ppm)	DQO (mg/L)	OD (mg/L)	Cor (UC)
AA	0,9 $\pm 0,5$	42.233 ± 14	18.100 ± 20	389 ± 39	8,5 $\pm 0,3$	2.083 ± 20
AV	7,4 $\pm 0,2$	41.533 ± 12	27.866 ± 13	27.364 ± 132	7,4 $\pm 0,2$	360.416 ± 36
AA+AV	1,3 $\pm 0,3$	NR	NR	8.471 ± 127	7,5 $\pm 0,1$	84.611 ± 24
DES	12,4 $\pm 0,2$	77.300 ± 20	27.730 ± 10	24.535 ± 456	0,03 $\pm 0,01$	137.500 ± 49
BRA	9,3 $\pm 0,2$	13.750 ± 27	6.850 ± 7	78,00 $\pm 3,06$	8,5 $\pm 0,7$	ND
NTR	0,8 $\pm 0,4$	33.895 ± 15	16.730 ± 30	85,00 $\pm 18,55$	8,7 $\pm 0,5$	ND
MIS	7,4 $\pm 0,3$	46.000 ± 10	14.300 ± 20	9.197 ± 172	5,9 $\pm 0,4$	90.200 ± 25
CONAMA 357/2005 ¹	6-9	-	500 mg/L	-	$\geq 4,0 \text{ mg/L}^2$	até 75 mg PT/L

Legenda: STD: Sólidos Totais Dissolvidos, DQO: Demanda Química de Oxigênio, OD: Oxigênio Dissolvido, UC: Unidade de Cor, ND: Não Detectado, NR: Não Realizado

Efluentes: AA: água amarela, AV: água vermelha, AA+AV: água amarela + água vermelha, DES: deslignificação, BRA: branqueamento, NTR: nitrificação, MIS: mistura.

¹ Legislação CONAMA 357/05: classificação dos corpos d'água e diretrizes para o seu enquadramento, e condições e padrões de lançamento de efluentes.

² Para águas de classe 1, 2 e 3 (CONAMA 357/2005).

Observando-se a Tabela 15 nota-se que os valores obtidos de pH, exceto os efluentes da mistura e AV, todos os demais não se enquadram nos padrões de lançamento estabelecidos pelo CONAMA 357/2005, que preconiza valores de 5 a 9. Devido ao pH esses efluentes

podem ainda causar impacto em estações de tratamento biológico. Esse resultado ratificou o trabalho realizado por Santos (2006), que encontrou pH de $13,07 \pm 0,2$ para o efluente da deslignificação e $11,3 \pm 0,5$ para o efluente do branqueamento, e também o trabalho de Rodrigues (2005), que encontrou pH de $1,0 \pm 0,03$ para a AA.

Todos os efluentes apresentaram valores de condutividade elevados, mesmo o do branqueamento, que apesar de ser o valor mais baixo ($13.750 \mu\text{S}/\text{cm}$) ainda pode ser considerado alto. Níveis maiores que $100 \mu\text{S}/\text{cm}$ indicam ambientes impactados, valores superiores a $3000 \mu\text{S}/\text{cm}$ já apresentam risco de salinização do solo, principalmente se as águas receptoras desses efluentes forem utilizadas para irrigação (QUEIROZ, 2004).

Os sólidos totais dissolvidos também foram bastante elevados. A Resolução CONAMA 357/2005 recomenda que para corpos aquáticos das Classes 1 e 2 o valor máximo do referido parâmetro seja de $500 \text{ mg}/\text{L}$. No caso da *Daphnia*, que se alimenta por filtração de compostos presentes na água, o elevado teor de sólidos dissolvidos pode causar obstrução do sistema filtrador levando o organismo à morte. Esse pode ser um dos fatores responsáveis pela toxicidade dos efluentes aos organismos.

Quanto ao parâmetro cor, pode-se ver pela Tabela 15, que exceto para os efluentes da nitrificação e branqueamento (transparentes), todos os demais são coloridos; alguns fortemente coloridos como os da AV, AA+AV e mistura, causando interferência em algumas análises.

Os teores de oxigênio dissolvido encontrados foram mais baixos para os efluentes da deslignificação e mistura $0,03$ e $5,9$, respectivamente. Tais resultados podem estar associados a presença de substâncias redutoras nos efluentes como sulfito. A Resolução CONAMA 357/2005 recomenda para os corpos aquáticos das Classes 1, 2 e 3 valores mínimos de oxigênio dissolvido, $6,0$; $4,0$ e $2,0 \text{ mg}/\text{L}$, respectivamente.

Os efluentes do branqueamento e nitrificação apresentaram os mais baixos valores de DQO ($85,16 \pm 18,55$ e $78,05 \pm 3,06 \text{ mg}/\text{L}$), respectivamente. Os efluentes da AV, deslignificação, mistura e AA+AV forneceram valores de DQO consideravelmente elevados. A presença de matéria orgânica quimicamente degradável como lignina e ácidos resinosos nos efluentes da deslignificação e mistura, e compostos nitroaromáticos nos efluentes da AA e AA+AV, pode ter causado esses valores de DQO tão elevados.

Ryon et al. (1984) também relataram que as águas residuárias do TNT provocaram aumento da DQO, da carga de sólidos (tanto dissolvido como suspenso), dos níveis de nitrogênio (nitratos, nitritos e nitrogênio Kjeldal), além dos níveis de sulfato, nos corpos

receptores desses efluentes. Os parâmetros menos afetados foram carbono orgânico total, pH e níveis de fosfato.

Posteriormente, esses autores, ao avaliarem alguns parâmetros físico-químicos em águas residuárias provenientes de uma planta de munições que produzia nitrocelulose, encontraram DQO de 2.915 mg/L, carbono orgânico total de 875 mg/L, nitratos 565 mg/L, sólidos dissolvidos de 2.716 mg/L e sólidos suspensos de 1.800 mg/L.

Santos (2006) encontrou 71 ± 1 mg/L de nitrogênio, menos que 5 mg/L de fósforo no efluente da deslignificação e 3.100 ± 500 mg/L de cloro residual no efluente do branqueamento. Rodrigues (2005) encontrou $83,9 \pm 0,9$ mg N.L⁻¹ de nitrogênio orgânico Kjeldal no efluente da água amarela.

O problema relacionado a esses parâmetros é o aumento de nutrientes, que proporciona o crescimento das algas e plantas aquáticas; a redução da penetração da luz, devido à coloração escura da AV, e conseqüente diminuição da taxa de fotossíntese; redução do oxigênio a ser utilizado pelos organismos, devido ao aporte de matéria orgânica; alteração nos parâmetros das águas, como pH, que provoca um estresse para a comunidade biótica.

5.3 Testes de Toxicidade Aguda

Os efluentes estudados no presente trabalho, oriundos da produção do 2,4,6-Trinitrotolueno e da Nitrocelulose, foram submetidos a ensaios ecotoxicológicos para determinação da sua toxicidade. A seguir, são apresentados os resultados dos referidos ensaios.

5.3.1 *Daphnia similis*

5.3.1.1 Efluentes da produção do TNT

Todos os efluentes avaliados foram tóxicos para o microcrustáceo *D. similis*. Os resultados dos testes de toxicidade aguda CE50 48 h para AA, AV e AA+AV (proporção de 77 e 23 %, respectivamente) foram 0,65%, 0,30% e 0,52%, respectivamente. O efluente da AV foi o mais tóxico dos três.

Na Figura 9 podem ser vistas as porcentagens de imobilidade causadas aos organismos *versus* as diluições dos efluentes estudados. Esses ensaios foram realizados de novembro a dezembro de 2006.

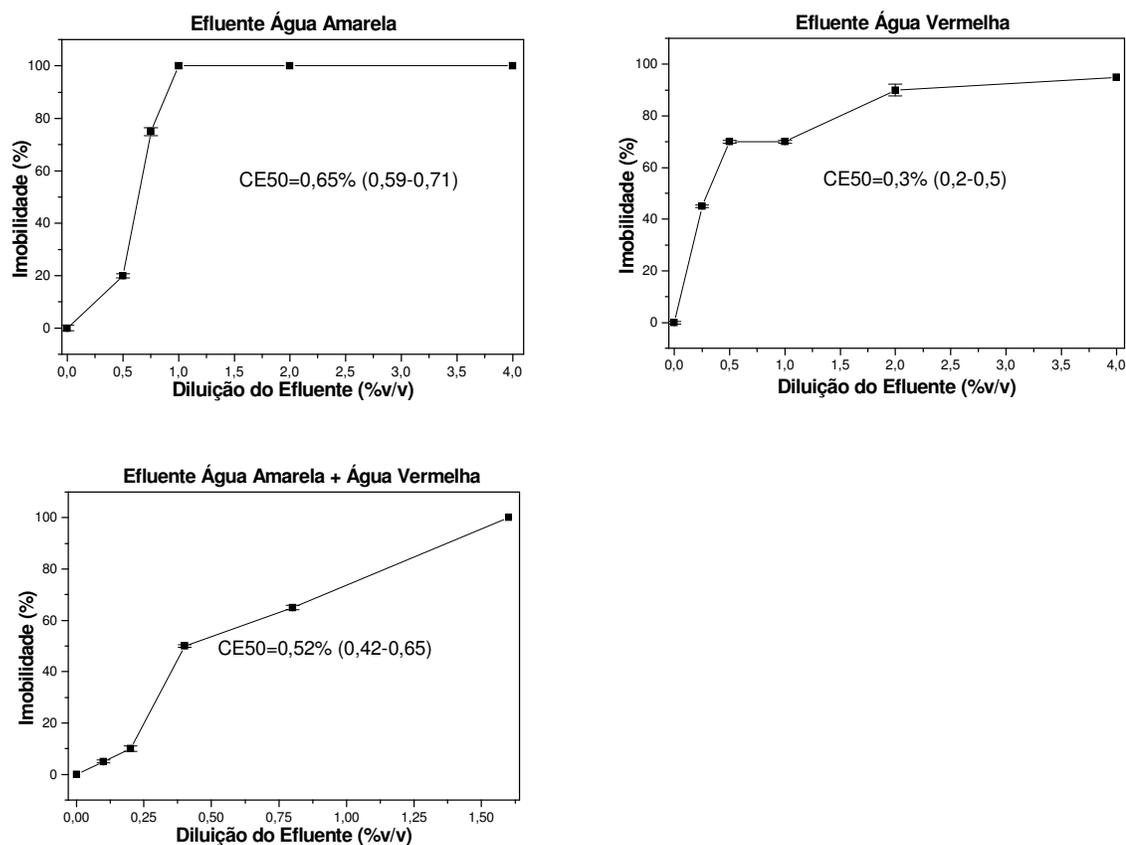


Figura 9 – Imobilidade (%) obtida nos ensaios de toxicidade aguda para *D. similis* com valores de CE50 48 h e respectivos intervalos de confiança para efluentes da produção de TNT: AA, AV e AA+AV, realizados nos meses de novembro a dezembro de 2006.

Nas Tabelas 16 a 18 são apresentados os valores das variáveis físico-químicas medidas no início e no final dos ensaios para os efluentes da produção do TNT. De forma geral, em todos os efluentes avaliados houve algumas variações no valor mínimo e máximo do pH (7,12 a 8,06), que sempre aumentou ao longo do teste. O oxigênio dissolvido teve reduções muito pequenas, ficando entre 8,0 e 9,0 mg/L. A dureza medida no início e final do ensaio também teve pouca variabilidade e não se mostrou tão dependente das diluições dos efluentes.

Tabela 16 - Resultados da determinação dos parâmetros físico-químicos (pH, condutividade, dureza e OD inicial e final) realizados durante os ensaios de toxicidade aguda com *D. similis* para a AA.

Efluente (%)	pH		Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$)		Dureza ($\text{mgL}^{-1} \text{CaCO}_3$)		OD (mg/L)	
	<i>i</i>	<i>f</i>	<i>i</i>	<i>f</i>	<i>i</i>	<i>f</i>	<i>i</i>	<i>f</i>
0	7,40	7,90	160,0	161,3	46,00	48,00	8,9	8,7
0,50	7,42	8,00	287,6	236,1	47,82	50,40	9,5	9,3
0,75	7,42	8,06	290,2	584,8	48,86	50,40	9,2	9,4
1,00	7,45	7,93	329,4	322,2	48,86	50,56	9,2	9,3
2,00	7,50	7,93	535,3	522,5	49,90	50,96	9,1	9,4
4,00	7,50	7,85	869,4	854,0	50,00	50,96	9,1	9,4

i: inicial; *f*: final

Tabela 17 - Resultados da determinação dos parâmetros físico-químicos (pH, condutividade, dureza e OD inicial e final) realizados durante os ensaios de toxicidade aguda com *D. similis* para a AV.

Efluente (%)	pH		Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$)		Dureza ($\text{mgL}^{-1} \text{CaCO}_3$)		OD (mg/L)	
	<i>i</i>	<i>f</i>	<i>i</i>	<i>f</i>	<i>i</i>	<i>f</i>	<i>i</i>	<i>f</i>
0	7,30	7,57	142,0	144,0	40,00	41,00	9,0	8,4
0,025	7,68	7,68	155,4	161,0	42,28	45,80	8,4	8,1
0,050	7,55	7,55	163,9	169,0	46,23	47,30	8,8	8,1
0,100	7,27	7,27	188,1	188,0	45,02	47,30	8,5	8,0
0,200	7,56	7,56	220,3	239,0	44,61	46,30	8,8	8,1
0,400	7,99	7,87	312,0	325,0	45,63	47,30	8,3	8,0

i: inicial; *f*: final

Tabela 18 – Resultados da determinação dos parâmetros físico-químicos (pH, condutividade, dureza e OD inicial e final) realizados durante os ensaios de toxicidade aguda com *D. similis* para a AA + AV.

Efluente (%)	pH		Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$)		Dureza ($\text{mgL}^{-1} \text{CaCO}_3$)		OD (mg/L)	
	<i>i</i>	<i>f</i>	<i>i</i>	<i>f</i>	<i>i</i>	<i>f</i>	<i>i</i>	<i>f</i>
0	7,20	7,57	142,0	144,0	40,00	41,00	9,0	8,4
0,10	7,49	7,22	188,0	161,0	40,56	47,00	8,4	8,2
0,20	7,15	7,48	218,0	161,0	41,57	41,82	8,5	8,3
0,40	7,12	7,67	301,0	231,0	41,57	44,36	8,4	8,3
0,80	7,12	7,64	450,0	323,0	41,57	44,36	8,3	8,3
1,60	7,16	7,58	730,0	688,0	41,57	44,36	8,1	8,3

i: inicial; *f*: final

O parâmetro que possuiu maior variabilidade foi a condutividade, que aumentou bastante conforme a concentração de inorgânicos nos efluentes, aumentou bastante, apresentando

grandes diferenças entre os valores iniciais e finais (AA:160-854 $\mu\text{S}/\text{cm}$; AV:142-325 $\mu\text{S}/\text{cm}$; AA+AV:142-730 $\mu\text{S}/\text{cm}$). O aumento da concentração dos efluentes foi bem reproduzido pela elevação da condutividade. Valores elevados desse parâmetro indicam a presença de sais nos efluentes, que por sua vez, tornam o meio externo mais concentrado do que o interior dos organismos levando estes à perda de água e ocorrendo então um efeito de osmose.

Conforme a revisão da literatura efetuada, não foram encontrados muitos trabalhos que abordem a toxicidade dos efluentes originados na fabricação do TNT. Exceto pelos estudos desenvolvidos no GTEMA/EEL/USP, como o de Rodrigues (2005), as demais pesquisas empregam o TNT como substância química pura. Nesse trabalho, ao se caracterizar o efluente AA foi determinado TNT solúvel da ordem de $156 \pm 10 \text{ mg}/\text{L}$ e uma massa de TNT precipitado, durante sua purificação, de aproximadamente $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Devido à escassez de trabalhos com águas residuárias da produção do TNT, foram utilizados para comparação de dados, estudos que demonstram a toxicidade deste como substância pura.

Dave et al. (2000) determinaram a toxicidade aguda de seis explosivos (ácido pícrico, trinitrotolueno, 2,4DNT, RDX, nitroguanidina e pentil) em fase aquosa, utilizando o microcrustáceo *D. magna*. A CE50 48 h para o TNT foi $12 \text{ mg}/\text{L}^{-1}$. A toxicidade dos outros explosivos foi similar ou menor do que a do TNT.

A partir de um banco de dados analisado por Martins et al. (2007) para avaliar o uso de ensaios ecotoxicológicos com *D. magna* e *D. rerio* como sistemas de alerta em águas contaminadas com substâncias tóxicas, encontrou-se valores de CL50 48 h para o TNT igual a $11,7 \text{ mg}/\text{L}$, utilizando *D. magna* como organismo-teste.

Liu et al (1983) avaliaram a toxicidade do TNT (solução $90 \text{ mg}/\text{L}$) e das águas residuárias de uma indústria de munições composta de diversos efluentes ($37 \text{ mg}/\text{L}$ de TNT e $23 \text{ mg}/\text{L}$ de RDX). Os valores de CL50 encontrados para *D. magna* foram $11,7$ e $11,6 \text{ mg}/\text{L}$ para o TNT e águas residuárias, respectivamente. Apesar desses efluentes serem tóxicos, eles possuíam concentrações de TNT inferiores às do presente trabalho.

Além do TNT, os seus produtos de transformação ambiental, incluindo arilaminas, arilhidroxilaminas e produtos condensados como compostos azo e azoxil, são igualmente ou mais tóxicos que seus compostos originais (HAWARI et al.,1999). De acordo com o estudo realizado por Ramos et al. (2002), *D. magna* mostrou-se muito sensível a algumas aminas aromáticas analisadas.

Liu et al. (1976) encontraram valor de CL50 igual a $35 \text{ mg}/\text{L}$ para *D. magna* quando exposta ao 2,4DNT. Pearson et al. (1979) utilizaram *D. magna* em um teste estático com 48 h de duração para determinar valores de CL50 de alguns subprodutos do TNT. Os valores

encontrados de CL50 (mg/L) foram: 35 para o 2,4DNT; 4,7 para o 2,3DNT e 0,69 para o 2,3,6-TNT.

Na produção do 2,4,6-TNT o 1,3-dinitrobenzeno é o terceiro composto formado em maior quantidade após o 2,4 e 2,6DNT. Durante a produção contínua do TNT são formados os compostos: 1,3-dinitrobenzeno, 3,5-dinitroanilina e 1,3,5-trinitrobenzeno, os dois últimos também ocorrem como produtos da fotólise do TNT em ambientes aquáticos. Schalie (1983) determinou a toxicidade do, 1,3,5-trinitrobenzeno, 3,5-dinitroanilina e 1,3-dinitrobenzeno utilizando *D. magna*. Para os compostos 3,5-dinitroanilina, 1,3-dinitrobenzeno e 1,3,5-trinitrobenzeno os valores de CE50 48 h foram 3,76 mg/L; 27,4 mg/L e 2,98 mg/L, respectivamente.

Logo, de acordo com os trabalhos apresentados, pode-se concluir que o TNT e os produtos formados durante a sua produção, são tóxicos e apresentam potencial de impacto aos organismos aquáticos dos corpos receptores.

5.3.1.2 Efluentes da produção da Nitrocelulose

Todos os efluentes avaliados causaram toxicidade a *D. similis*. Os efluentes da deslignificação, mistura e nitração tiveram CE50 48 h igual a 0,23; 2,64% e 22,69%, respectivamente. O efluente do branqueamento causou 100% de imobilidade aos organismos até a concentração de 0,05%. O efluente da nitração foi o menos tóxico dos três. Na Figura 10 podem ser vistas as porcentagens de imobilidade causadas aos organismos *versus* as diluições dos efluentes.

Nas Tabelas 19 a 22 são apresentados os valores das variáveis físico-químicas medidas ao início e ao final dos ensaios para os efluentes da produção de nitrocelulose. No contexto geral, os valores de pH variaram entre 7,20 e 7,96 para todos os efluentes. O OD oscilou entre 8,9 (valor mais alto) e 4,9 mg/L (valor mais baixo), para o efluente do branqueamento e mistura, respectivamente. No entanto, o pH e o OD estiveram dentro da faixa recomendada pela NBR 12713:04 para ensaios com *Daphnia*. A dureza aumentou em função da concentração de efluentes nas soluções-teste. Novamente a condutividade teve a maior faixa de variação, também em função das diluições dos efluentes, mostrando que os mesmos possuem expressivas quantidades de sais dissolvidos, podendo causar os mesmos problemas relatados no item 5.3.1.1.

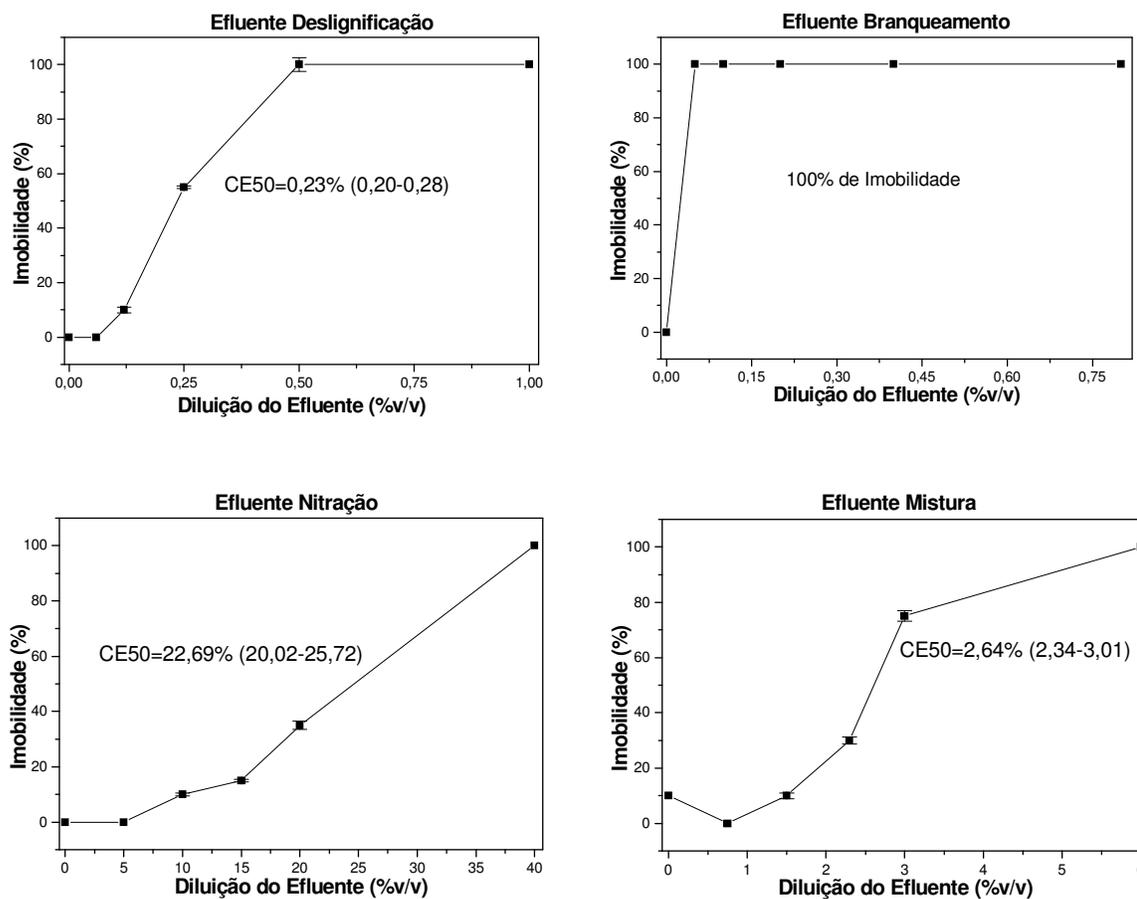


Figura 10 – Imobilidade (%) obtida nos ensaios de toxicidade aguda para *D. similis* com valores de CE50 48 h e respectivos intervalos de confiança para efluentes da produção de nitrocelulose: designificação, branqueamento, nitração e mistura dos efluentes. Ensaios foram realizados no mês de dezembro de 2006.

Tabela 19 - Resultados da determinação dos parâmetros físico-químicos (pH, condutividade, dureza e OD inicial e final) realizados durante os ensaios de toxicidade aguda com *D. similis* para o efluente da deslignificação.

Efluente (%)	pH		Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$)		Dureza ($\text{mgL}^{-1} \text{CaCO}_3$)		OD (mg/L)	
	<i>i</i>	<i>f</i>	<i>i</i>	<i>f</i>	<i>i</i>	<i>f</i>	<i>i</i>	<i>f</i>
0	7,20	7,30	140,3	142,6	43,00	44,00	7,7	7,5
0,06	7,84	7,94	192,1	156,2	68,30	75,75	7,4	8,3
0,12	7,87	7,91	180,3	170,8	68,30	74,30	6,0	7,8
0,25	7,50	7,86	212,5	214,1	68,30	75,75	7,3	8,7
0,50	7,43	7,85	287,5	279,5	69,30	73,75	6,3	5,8
1,00	7,27	7,90	436,2	428,0	69,30	73,90	6,9	6,3

i: inicial; *f*: final

Tabela 20 - Resultados da determinação dos parâmetros físico-químicos (pH, condutividade, dureza e OD inicial e final) realizados durante os ensaios de toxicidade aguda com *D. similis* para o efluente do branqueamento.

Efluente (%)	pH		Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$)		Dureza ($\text{mgL}^{-1} \text{CaCO}_3$)		OD (mg/L)	
	<i>i</i>	<i>f</i>	<i>i</i>	<i>f</i>	<i>i</i>	<i>f</i>	<i>i</i>	<i>f</i>
0	7,20	7,80	125,4	130,3	45,00	44,00	8,1	7,7
0,05	7,21	7,81	135,4	145,0	48,07	49,08	8,0	8,2
0,10	7,30	7,59	145,0	154,8	47,07	48,60	8,8	7,8
0,20	7,30	7,60	153,0	166,7	45,07	46,80	8,9	7,4
0,40	7,31	7,29	160,0	173,2	45,07	46,80	7,7	7,6
0,50	7,33	7,88	167,8	178,4	46,07	47,90	7,9	7,8

i: inicial; *f*: final

Tabela 21 - Resultados da determinação dos parâmetros físico-químicos (pH, condutividade em mili Simens, dureza e OD inicial e final) realizados durante os ensaios de toxicidade aguda com *D. similis* para o efluente da nitrificação.

Efluente (%)	pH		Condutividade (mS/cm)		Dureza ($\text{mgL}^{-1} \text{CaCO}_3$)		OD (mg/L)	
	<i>i</i>	<i>f</i>	<i>i</i>	<i>f</i>	<i>i</i>	<i>f</i>	<i>i</i>	<i>f</i>
0	7,20	7,30	0,140	0,142	43,00	44,00	7,7	7,5
5	7,70	7,71	1,202	1,340	44,47	51,47	5,9	5,8
10	7,50	7,80	2.253,0	2.333,0	43,07	47,37	7,0	6,4
15	7,70	7,69	3.185,0	3.252,0	42,06	48,68	8,0	8,3
20	7,70	7,84	3.947,0	4.201,0	43,07	50,08	5,6	6,8
40	7,60	7,66	7.451,0	7.929,0	42,06	50,08	5,7	6,2

i: inicial; *f*: final

Tabela 22 - Resultados da determinação dos parâmetros físico-químicos (pH, condutividade, dureza e OD inicial e final) realizados durante os ensaios de toxicidade aguda com *D. similis* para o efluente da mistura.

Efluente (%)	pH		Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$)		Dureza $\text{mgL}^{-1} \text{CaCO}_3$		OD (mg/L)	
	<i>i</i>	<i>f</i>	<i>i</i>	<i>f</i>	<i>i</i>	<i>f</i>	<i>i</i>	<i>f</i>
0	7,20	7,30	140,3	142,6	45,00	47,00	7,7	7,5
0,75	7,43	7,90	287,2	318,7	50,08	57,24	5,4	6,5
1,50	7,22	7,91	444,3	494,5	55,09	58,43	5,0	5,7
2,30	7,35	7,98	624,3	688,3	53,08	60,39	5,0	5,4
3,00	7,27	7,98	767,1	849,3	55,09	58,69	4,9	5,1
6,00	7,31	7,96	1.402,0	1.541,0	54,08	60,10	5,7	5,6

i: inicial; *f*: final

Apesar do organismo utilizado no presente trabalho ser *D. similis*, alguns resultados aqui obtidos serão comparados a toxicidade de *D. magna*. Buratini et al. (2004), com objetivo de validar o uso de *D. similis* como espécie teste, fizeram um estudo comparativo utilizando dados obtidos em testes de toxicidade aguda com essa espécie e *D. magna*. Baseado nos resultados de toxicidade aguda, testes com compostos químicos e efluentes industriais, as duas espécies exibiram sensibilidade similar à maioria das amostras avaliadas. A CE50 da *D. similis* ao fenol e aos efluentes de uma indústria papelreira foram 52,13 e 637,07 mg/L, respectivamente.

Assim como os efluentes da fabricação de polpa e papel a partir da madeira, os efluentes da produção de nitrocelulose a partir do algodão contém poluentes de natural ocorrência nas fibras da madeira e no algodão, como os extrativos (taninos, ácidos resinosos e estilbenos), lignina e compostos xenobióticos formados durante os processos de polpação e fabricação do papel (ligninas cloradas, ácidos resinosos, fenóis, dioxinas e furanos). Esses compostos são liberados durante a fabricação da nitrocelulose ou do papel, causando grandes impactos aos organismos vivos dos corpos receptores (ALI e SREEKRISHNAN, 2001).

Os efluentes da deslignificação contém extrativos como os ácidos resinosos, ácidos graxos, diterpenos e fitosteróis. Após o branqueamento com cloro, os efluentes contém esses compostos, assim como fenóis clorados, ácidos clorados, álcoois, aldeídos, cetonas, açúcares e hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos (ENVIRONMENT CANADA, 1991). Os ácidos abiético e dehidroabiético são dois componentes principais dos ácidos resinosos. A toxicidade aguda dos efluentes de polpa de papel tem sido relacionada ao conteúdo geral de extrativos do

efluente. Os derivados dos ácidos deidroabiéticos têm mostrado serem recalcitrantes biologicamente e mais tóxicos do que os seus derivados não clorados (LISS et al., 1997).

Kamaya et al. (2005) investigaram os efeitos dos ácidos abiético e deidroabiético na sobrevivência, reprodução e crescimento de *D. magna*. A CE50 48 h dos testes de toxicidade aguda foi igual a 7,48 mg/L e 7,98mg/L para os ácidos abiético e deidroabiético, respectivamente. Nos ensaios de toxicidade crônica (21 dias), os autores observaram que os dois ácidos na concentração de 8,0 mg/L, causaram mortalidade dos organismos. Os resultados indicaram que ambos os ácidos, têm potencial de causar uma pequena redução corporal sem efeitos negativos aparentes na reprodução de *D. magna* em concentrações não letais. O ácido isopimárico foi o mais tóxico (CL50 48 h igual a 0,07 mg/L).

Martins et al. (2007) reuniram diversos resultados de ensaios ecotoxicológicos com *D. magna* e *D. rerio* em um banco de dados. Utilizando *D. magna* como organismo-teste para avaliar a toxicidade do ácido abiético encontrou-se valores de CL50 24 e 48 h iguais a 1,0 e 0,68 mg/L, respectivamente. Para o ácido deidroabiético encontraram valores de CL50 24 e 48 h iguais a 1,89 e 1,28 mg/L, respectivamente, e CE50 24 h igual a 22,623 mg/L. Para o ácido pimárico, os valores reportados foram CL50 24 e 48 h igual a 0,54 e 0,26 mg/L, respectivamente.

Conforme os resultados apresentados acima, pode-se observar que os valores de CE50 ou CL50 24 h sempre são maiores do que os valores encontrados com 48 h e que esses compostos são bastante tóxicos, já que baixas doses foram capazes de produzir efeitos nos organismos testados.

Zanella (1983) relatou que os ácidos resinosos são menos tóxicos para peixes do que para invertebrados. Os ácidos resinosos têm sido identificados como principais agentes causadores de toxicidade nos efluentes das indústrias de papel e celulose. Rigol et al. (2003) relataram que diferentes ácidos resinosos mostraram valores semelhantes de toxicidade aguda para *D. magna*. Os ácidos abiético e deidroabiético foram os menos tóxicos, CL50 24 h igual a 1,0 e 1,89 mg/L, respectivamente. O ácido isopimárico foi o mais tóxico, CL50 24 h igual a 0,26 mg/L.

Penge e Roberts (2000) determinaram a toxicidade aguda de oito ácidos resinosos, dentre eles os ácidos abiéticos e deidroabiéticos, utilizando bioensaio com *D. magna*. Os autores determinaram a CL50 em diferentes períodos de exposição (24, 48 e 96 h). A CL50 48 h para os ácidos abiético e deidroabiético foi de 0,68 e 1,28 mg/L, respectivamente.

Compostos presentes nos efluentes da deslignificação, como os extrativos, inclusive a lignina, podem estar relacionados à elevada toxicidade encontrada para este efluente, CE50 de

0,23%. Santos (2001) avaliou a composição do algodão utilizado para produção de nitrocelulose e encontrou $4,2 \pm 0,3$ % de extrativos e $6,6 \pm 0,2$ % de lignina Klason insolúvel e $2,34 \pm 0,3$ % de lignina Klason solúvel. Esses dados confirmam que a toxicidade encontrada nos efluentes analisados pode realmente estar relacionada com a presença dos compostos identificados.

Lee et al. (2006) avaliaram a toxicidade de 16 compostos fenólicos em função das suas propriedades físicas e químicas para a alga *P. subcaptata* e o microcrustáceo *Daphnia magna*. O objetivo desse trabalho era determinar se havia uma relação linear entre o coeficiente de partição octanol-água (K_{OW}) e a toxicidade dos organismos utilizados já que o valor do K_{OW} é conhecido por aumentar em função do aumento do número de átomos do cloro. Os resultados demonstraram que os compostos fenólicos com alto coeficiente de partição octanol-água (K_{OW}) tiveram elevada toxicidade para os organismos aquáticos. O valor da CL50 para *D. magna* foi 2,09 μ M.

A possível correlação entre alguns parâmetros que podem indicar componentes perigosos nas águas como, AOX, COT e NT (nitrogênio total), com efeitos biológicos observados em diferentes bioensaios, dentre eles, o microcrustáceo *D. magna*, foi investigada por Gellert (2000). A amostra de efluente que possuiu maior e mais freqüente toxicidade foi representada pela tipologia C do estudo (efluentes da produção de óleo mineral, compostos aromáticos, indústria farmacêutica, pesticidas e químicos para produção de plásticos), a mesma continha maior concentração de AOX e maior toxicidade para *D. magna*. Deste modo, o autor estabeleceu uma possível correlação entre concentração de AOX e toxicidade.

Vetrano (2001) relata que os invertebrados aquáticos podem ser as espécies mais sensíveis ao cloro e aos produtos de reação do cloro nas águas. A avaliação dos efeitos do cloro e produtos de cloração na água depende da forma em que o cloro se encontra, livre ou residual, assim como do organismo e do estágio de vida em que o mesmo se encontra. A magnitude da toxicidade parece depender do estágio do ciclo de vida (jovens são mais sensíveis que adultos), da temperatura (o cloro é mais tóxico em altas temperaturas), do tempo de exposição e da espécie-teste em questão. Mattice et al. (1981) conduziram dois estudos expondo *D. magna* à diferentes concentrações de cloro residual total. Em cada estudo encontraram-se valores de CL50 iguais a 0,097 e 0,063 mg/L.

Chen et al. (2001) utilizaram diferentes organismos aquáticos, dentre eles *D. similis*, para testar a toxicidade de um efluente têxtil clorado com NaOCl (hipoclorito de sódio) após tratamento. Os bioensaios mostraram que após o tratamento e adição do NaOCl houve aumento da toxicidade. A toxicidade do efluente clorado na saída da estação de tratamento

para *D. similis* foi CE50 de 44,93%. A concentração de cloro residual variou de 0,1-2 mg/L, valores bastante elevados já que concentrações da ordem de ppb ($\mu\text{g/L}$) causam toxicidade. O cloro residual pode ter contribuído parcialmente para os efeitos tóxicos observados nesse estudo, mas outros compostos orgânicos clorados ou oxidados, como os trihalometanos, podem ter sido responsáveis também.

Santos (2006) encontrou valores de cloro residual no efluente do branqueamento iguais a 3.100 ± 500 mg/L, valor esse muito superior ao que foi encontrado por Chen et al. (2001). Tal informação pode justificar o fato de não ter sido possível determinar a CE50 48 h do efluente do branqueamento para *D. similis*.

Bentley et al. (1977) avaliaram a CE50 de várias espécies de macroinvertebrados aquáticos, inclusive *D. magna*, utilizando resíduos de nitrocelulose coletados em um tanque de uma indústria produtora de munições, com 11,8% de nitrocelulose ativa. Em todos os testes os autores utilizaram concentrações de 0; 560; 750 e 1000 mg/L. A maior concentração representa um nível com três ordens de magnitude, maior do que aqueles esperados nos corpos receptores associados a esta indústria. Os resultados obtidos foram negativos para todos os organismos testados, inclusive *D. magna*, até a concentração testada de 1000 mg/L.

Contrariamente aos resultados obtidos por Bentley et al. (1977), os efluentes da etapa de nitrificação analisados neste estudo foram capazes de causar toxicidade aguda a *D. similis* em concentração de 22,69%. Alguns fatores que poderiam estar ligados à ocorrência de toxicidade nesse efluente é a elevada condutividade e a concentração de sólidos.

A difenilamina é um composto utilizado como um estabilizador de explosivos e propelentes contendo nitrocelulose. Na indústria onde foram coletados os efluentes deste estudo também se utiliza este composto. Dave et al. (2000) avaliaram a toxicidade aguda da difenilamina utilizando *D. magna*. Os resultados mostraram que este agente é extremamente tóxico com valor de CE50 48h igual a $1,2 \text{ mg/L}^{-1}$.

Villegas-Navarro et al. (2001) utilizaram dafnídeos para estimar a CL50 das águas residuárias coletadas de diferentes estágios da produção de uma indústria têxtil, dentre esses estágios, o do branqueamento das fibras que utiliza NaClO como agente branqueante. O resultado do ensaio dessa etapa de produção para determinação da CL50 48 h com *D. magna* foi $0,6 \pm 0,2$. Foram encontrados valores residuais de ClO⁻ em concentrações que variavam de 0,2 a 6,8 mg/L.

Pode-se concluir então, através dos dados obtidos nos ensaios de toxicidade com os efluentes da produção de nitrocelulose, que os mesmos são tóxicos para *D. similis*. A revisão de literatura efetuada, aponta diversos compostos presentes nos efluentes da deslignificação,

branqueamento e nitração (lignina, extrativos, cloro, compostos clorados, compostos fenólicos, entre outros) que são os prováveis causadores dessa toxicidade..

5.3.2 *Escherichia coli*

5.3.2.1 Efluentes da produção do TNT

A inibição do crescimento da bactéria *E.coli* em presença dos efluentes da produção do TNT, indicou que estes causaram toxicidade aguda. Os resultados destes testes são apresentados na Figura 11.

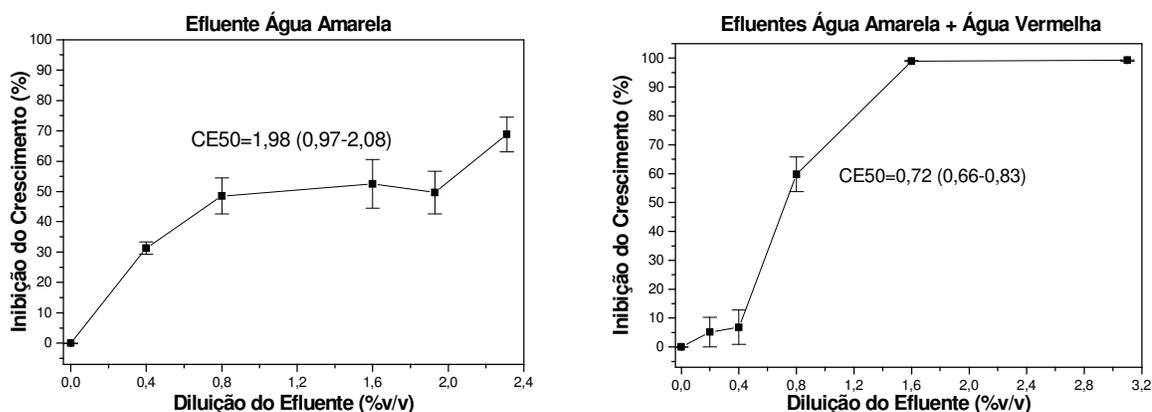


Figura 11 – Inibição (%) de crescimento de *E. coli* obtida nos ensaios de toxicidade aguda com valores de CE50 6 h e respectivos intervalos de confiança, para efluentes da produção de TNT: AA e AA+AV na proporção de 77 e 23 %, respectivamente. Ensaio realizado no período de julho a agosto de 2006.

Os efluentes avaliados podem ser considerados tóxicos, visto que os valores de CE50 6 h da AA e da AA+AV foram bastante baixas: 1,98% e 0,72%, respectivamente. A determinação da toxicidade do efluente da AV não foi possível por esta metodologia, em virtude da sua forte coloração (360.416 ± 36 U_c). Como a medição da turbidez das amostras – que reflete o crescimento ou inibição dos microorganismos – é feita em espectrofotômetro, torna-se necessária a realização de grandes diluições da amostra o que confere erro ao teste (diluições maiores que 1 ml de amostra/3mL de água destilada). Portanto, esta metodologia não é indicada para efluentes fortemente coloridos e que não causam toxicidade nas suas maiores

diluições. A toxicidade do efluente da AA+AV pôde ser determinada porque o mesmo é muito tóxico e foi utilizado em diluições de 3,1 a 0,2%.

A maioria dos ensaios utiliza o princípio da inibição do crescimento bacteriano ou viabilidade da célula na presença de agentes tóxicos, medindo o crescimento turbidimetricamente, por unidades formadoras de colônias ou câmaras de contagem celular. Existem algumas variações dessas metodologias em relação à temperatura de cultivo e aos microrganismos usados (ALSOP et al., 1980; FULLER; MANNING Jr., 1997; KURIENKO et al., 2003; KURIENKO et al., 2005; SLABBERT, 1986; TREVORS et al., 1981). A seguir são apresentados alguns estudos sobre a toxicidade do TNT.

Rodrigues (2005) avaliou a toxicidade do efluente da AA gerado durante a produção do TNT utilizando *E.coli* e o fungo *Phanerochaete chrisosporium*. Como resultado, ele obteve um percentual de 89,2 % de inibição do crescimento celular de *E.coli* e CE50 de 20,05% para inibição do crescimento do halo radial do fungo.

Kurinenko et. al. (2007) expuseram uma cultura de *E. coli* K12 a 200 mg/L de TNT e observaram que esta concentração causou uma no número de unidades formadoras de colônias. Tal resultado foi atribuído ao aumento da permeabilidade da membrana lipoproteína externa das células, em presença do TNT, que causou também, aumento do índice refrativo das células. Além disso, mudanças no formato das células, que passaram da forma de bacilos para cocos e redução do tamanho celular, sendo observado que tais efeitos eram reversíveis. Enzinger (1971) também observou mudanças morfológicas em bactérias expostas a concentrações maiores que 30 ppm de TNT.

Um outro estudo realizado anteriormente por Kurinenko et al. (2005), compararam a sensibilidade das cepas K-12 e 055 de *E. coli* ao TNT. Concentrações de 100-200 mg/L de TNT suprimiram o crescimento da *E. coli* 055 enquanto que a cepa K-12 não foi inibida. A cepa 055 foi mais sensível em razão da baixa proteção da sua membrana lipoprotéica externa à entrada de compostos xenobióticos na célula. A adaptação a concentrações tóxicas do TNT pode envolver mecanismos de nitroredução e desnitrificação dessa substância.

Fuller e Manning (1997) conduziram uma sistemática de avaliação da habilidade de diferentes gêneros de bactérias transformarem o TNT e crescerem em sua presença. De acordo com os resultados, a bactéria *E.coli* ATCC (11775) não teve seu crescimento inibido na concentração de 66 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ de TNT e ainda apresentou um consumo líquido de 2ADNT e 4ADNT da ordem de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$.

Cherepnev et al. (2007) determinaram a magnitude do potencial transmembrana das células de *E.coli* K12 pelo método de citofluorometria, para diferentes fases do crescimento

celular. Em presença de 200 mg/L de TNT, o valor médio de potencial transmembrana nas células da população, que cresceu com TNT, foi substancialmente menor do que no controle. Isso foi devido à grande fração da subpopulação de *E. coli* com baixo valor do potencial transmembrana. Uma vez que o TNT foi eliminado, a distribuição do potencial transmembrana nas células da cultura se tornaram unimodais e próximos aos valores do controle na fase log de crescimento. Esses resultados podem indicar a heterogeneidade das culturas de *E. coli*, bem como a existência de um mecanismo de adaptação à presença de xenobióticos.

A presença dos compostos nitroaromáticos no ambiente criaram intensa pressão seletiva, que levou os microrganismos a evoluírem e serem capazes de degradá-los (NISHINO et al., 2000). A utilização do TNT como fonte de N envolve a remoção do nitrogênio do anel nitroareno. Isto é conseguido através da remoção direta do nitrito, que é reduzido a íons amônio (ESTEVE-NÚÑES et al., 2001) ou através da remoção do nitrogênio como amônio, após a redução do grupo nitro do anel aromático ao seu derivado hidroxilamino, o qual por sua vez participa da reação do tipo Bamberger, cujos intermediários podem promover a liberação do amônio (CABALLERO; RAMOS, 2006).

Confirmando o mecanismo exposto acima, GONZÁLEZ-PÉREZ et al. (2007) descobriram que, uma cepa selvagem de *E. coli* AB1157 apresenta múltiplas enzimas, capazes de atacar o TNT *in vitro* e usá-lo como fonte de N. Uma dessas enzimas identificadas foi uma redutase xenobiótica [N-etilmaliemida (NEM) redutase]. Algumas das enzimas identificadas (NemA, junto com NfsA e NfsB) reduzem o grupo nitro do anel aromático ao seu correspondente, um derivado hidroxilamino, o qual provavelmente resulta na liberação de íons amônia, que são usados como fonte de nitrogênio para o crescimento de *E. coli*.

No entanto, aparentemente, os microrganismos não podem usar o TNT, RDX ou HMX (ciclotetrametilentantramina) como fonte primária de substrato de carbono e energia para o seu crescimento. Em vez disso, geralmente prevalecem às reações cometabólicas. Sob condições aeróbicas ou anaeróbicas, normalmente os microrganismos reduzem os grupos nitro dos nitroaromáticos a amino (HAWARI et. al., 1999).

O mecanismo mais aceito da toxicidade do TNT é a ligação covalente dos hidroxilamino-dinitrotoluenos e/ou seus produtos de reoxidação nitroso a proteínas. Além do mais, os hidroxilamino-dinitrotoluenos sofrem transição redox oxidativa catalisada por metal, causando dano ao DNA celular (SARLAUSKAS et al., 2004).

Devido ao grande interesse em remover o TNT de áreas contaminadas, muitos estudos têm sido feitos para compreender os mecanismos de degradação do TNT por microrganismos

(ESTEVE-NÚÑEZ, 2001; FULLER; MANNING, 1997; GONZÁLES-PEREZ et al., 2007; KURINENKO et al., 2003; SARLAUSKAS et a., 2004). Todos os explosivos orgânicos e seus resíduos podem ser degradados na água e no solo, sob influência de microrganismos, luz, oxigênio e químicos redutores (SPAIN, 2000; STUCKI, 2004). Em predomínio de condições aeróbicas, estando à substância bem distribuída no solo ou na água, o primeiro passo da degradação do TNT é a redução do grupo nitro a hidroxilamino. A influência do oxigênio leva à produção do grupo intermediário, um composto azoxil, seguido pela formação de aminas. Os produtos resultantes formados, com ou sem influência do oxigênio, são mono-, di- tri-amino nitrotoluenos (STUCKI, 2004).

Além do TNT, a AA possui diversas impurezas contidas na sua composição – ácido nítrico e sulfúrico residuais, ácido trinitrobenzóico, entre outros. A AV produzida é resultante de uma lavagem com uma solução de sulfito de sódio (Na_2SO_3) que reage com formas assimétricas do TNT. Logo, a combinação desses efluentes: AA e AV geraram um outro efluente, AA +AV com uma grande variedade de compostos que podem interagir entre si e apresentar um outro perfil de toxicidade. De acordo com os resultados obtidos nesse trabalho, todos os efluentes estudados foram tóxicos para a bactéria *E.coli*, porém, AV foi o efluente mais tóxico, AA o menos tóxico e AA+AV teve toxicidade intermediária entre ambos. A cepa bacteriana utilizada neste trabalho, apesar de não ter sido identificada, mostrou-se sensível e até nas menores concentrações testadas não mostrou qualquer indício de estimulação de crescimento.

Portanto, de acordo com os trabalhos apresentados, existe grande variabilidade na sensibilidade das cepas de *E.coli* ao TNT. Diferentes são os mecanismos que este microrganismo desenvolve para se adaptar a concentrações do TNT ou, para ser inibido por ele.

5.3.2.2 Efluentes da produção da Nitrocelulose

Os efluentes avaliados apresentaram diferentes graus de toxicidade ou até mesmo ausência de efeito tóxico, como no caso do efluente da nitração, que não causou inibição do crescimento bacteriano até a concentração de 87,5%, Figura 12. Contrariamente, os efluentes do branqueamento e da mistura apresentaram uma CE50 de 36,6% e 2,4%, respectivamente. Os três efluentes juntos revelaram possuir um efeito sinérgico, pois a junção deles produziu um efluente com maior toxicidade do que cada um isoladamente. A realização do ensaio

ecotoxicológico com o efluente da deslignificação sozinho não foi possível devido a sua forte coloração.

Santos (2001) avaliou a toxicidade dos efluentes das etapas da produção de nitrocelulose (deslignificação, branqueamento e nitração) utilizando a metodologia de monitoramento de CO₂ pelo sistema Fia-Conduítmétrico com *E.coli*. Foram utilizadas três concentrações (2%, 6% e 10%) para todos os efluentes. Os resultados obtidos por este autor demonstraram que 2% do efluente da deslignificação e do branqueamento causaram 69 e 100% de inibição, respectivamente, na produção de CO₂. Entretanto, 10% do efluente da nitrocelulose não causou qualquer inibição na respiração bacteriana.

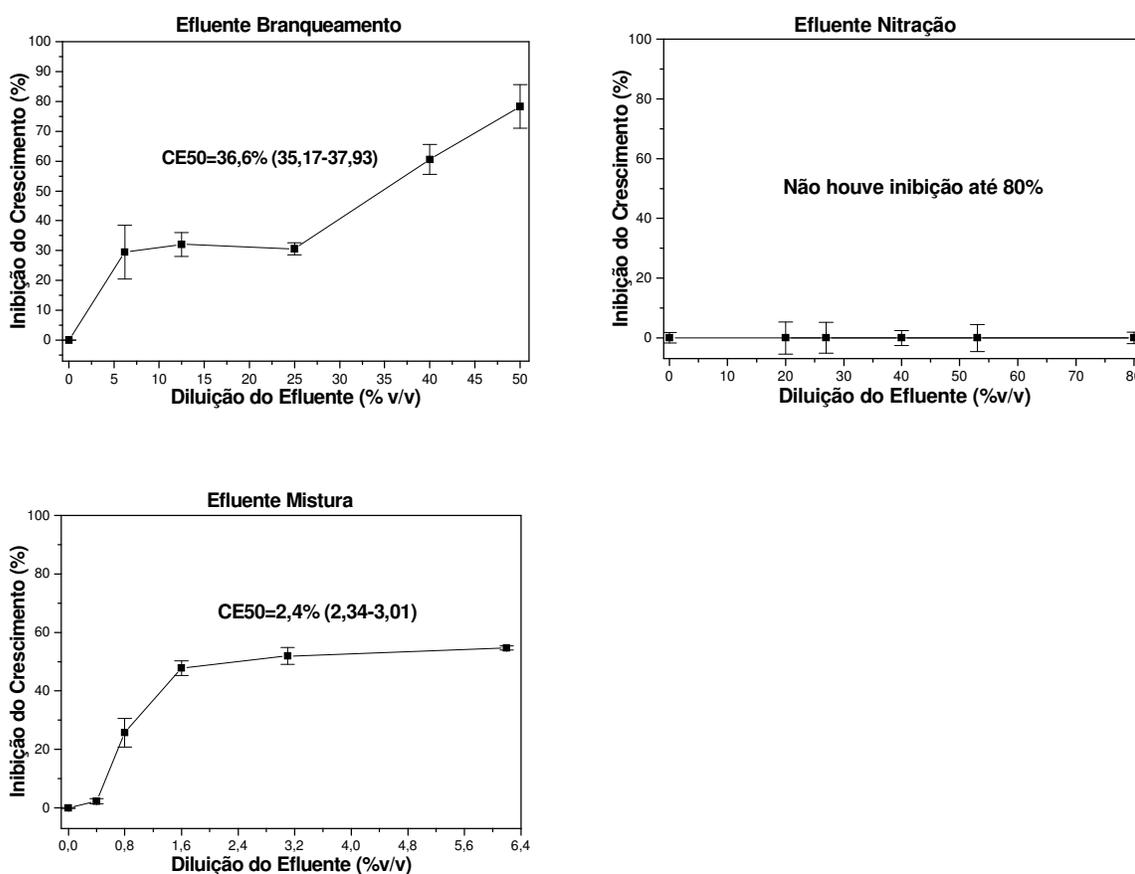


Figura 12 – Inibição (%) de crescimento de *E. coli* obtido nos ensaios de toxicidade aguda para com valores de CE50 6 h e respectivos intervalos de confiança para efluentes da nitração, branqueamento e mistura (deslignificação + branqueamento + nitração) na proporção de 1:1:1, ensaios realizados no período de julho a setembro de 2006.

Cenci et al. (1987) avaliaram a toxicidade de diferentes compostos, dentre eles o fenol e o pentaclorofenol, utilizando a bactéria *E. coli* 9001. Os resultados obtidos de inibição do crescimento bacteriano (CIp à 50%) mostraram que todos os compostos avaliados eram

tóxicos. O valor de CIp a 50% diminuiu gradativamente com o aumento do valor do número de substituintes, os valores de CIp a 50% do fenol e do pentaclorofenol foram 7,90 e 0,10 mg/L, respectivamente.

Chen e Lu (2002) realizaram ensaios para avaliar a toxicidade do fenol utilizando *E. coli* e o sistema Microtox. Os resultados obtidos foram CE50 de 1.984 mg/L para *E. coli* e 22.1 mg/L para Microtox.

Poucos dados foram encontrados sobre a toxicidade de compostos existentes nos efluentes da produção de nitrocelulose para *E. coli*. No entanto, a avaliação ecotoxicológica realizada no presente estudo, indica que o microrganismo utilizado mostrou diferentes graus de sensibilidade aos efluentes avaliados, não sendo inibido pelo efluente da nitração, o menos tóxico.

5.3.3 *Pseudomonas putida*

5.3.3.1 Efluentes da produção do TNT

A avaliação da toxicidade aguda dos efluentes AA e AA + AV por inibição do crescimento da bactéria *P. putida* apresentou valores de CE50 6 h iguais a 1,74% e 1,8%, respectivamente. Estes resultados podem ser vistos na Figura 13. Conforme os dados obtidos, ambos efluentes podem ser considerados tóxicos. Não foi possível a realização do ensaio com a água vermelha pelo mesmo motivo citado no item 5.3.2.2

Apesar dos resultados obtidos neste trabalho apontarem que *P.putida* foi eficiente em indicar toxicidade nos efluentes avaliados, poucos estudos foram encontrados retratando a utilização do gênero *Pseudomonas* em ensaios ecotoxicológicos para o TNT. Boa parte do material bibliográfico encontrado se referia a degradação do TNT por *Pseudomonas* (ESTEVE-NÚÑES, 2001; FULLER; MANNING, 1997; WON et al., 1974).

Um estudo conduzido por Fuller e Manning (1997) para avaliar a habilidade de diferentes gêneros de bactérias transformarem o TNT e, crescerem em sua presença, detectou que a bactéria *P. putida* ATCC (12633) não sofreu inibição em 66 $\mu\text{g/mL}^{-1}$ de TNT e ainda apresentou um consumo líquido de 2ADNT e 4ADNT da ordem de 3 $\mu\text{g/mL}^{-1}$.

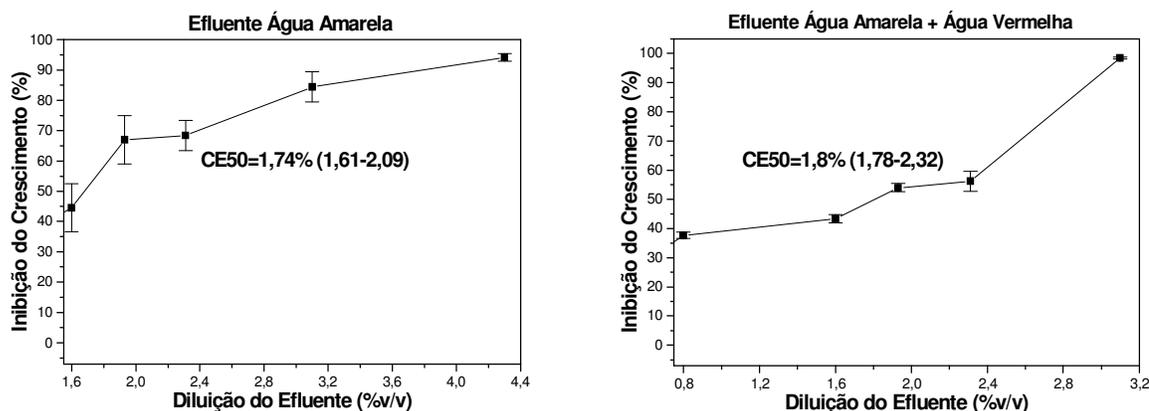


Figura 13 – Inibição (%) de crescimento de *P. putida* obtido nos ensaios de toxicidade aguda com valores de CE50 6 h e respectivos intervalos de confiança para efluentes da produção de TNT: AA e mistura da AA + AV na proporção de 77 e 23 % respectivamente. Ensaios realizados de julho a agosto de 2006.

Alguns estudos em laboratório demonstraram a capacidade do gênero *Pseudomonas* em reduzir o TNT sob condições aeróbicas a monoaminodinitrotolueno e a diaminomononitrotolueno (SCHACMANN; MULLHER, 1991).

Pseudomonas, isoladas de tanques de lodo e amostras de água coletadas no “United States Naval Ammunition Department at McAlester”, Oklahoma, foram identificadas como sendo capazes de biotransformar o Trinitrotolueno. As culturas suplementadas com extrato de levedura degradaram o 2,4,6-trinitrotolueno mais rapidamente. No isolado mais ativo, a completa diferenciação foi encontrada em 24 h. Os produtos de degradação identificados incluíram: 2,2',6,6'-tetrinitro-4,4'-azoxiltolueno; 9,4',6,6'-tetrinitro-2,2'-azoxiltolueno; 2-amino-4,6-dinitrotolueno; 4-hidroxilamino-2,6-dinitrotolueno e o nitrodiaminotolueno (WON et al.,1974).

Uma outra aplicação de bactérias para identificação de toxicidade aguda em efluentes industriais, foi a montagem de um biossensor amperométrico baseado na inibição da *P. putida* por Farré e Barceló (2001). Esse sistema usa um componente biológico imobilizado em um eletrodo descartável. As respostas para um grupo selecionado substâncias polares padrão foram estudadas usando *P. putida* como componente biológico. De acordo com esses autores, algumas das vantagens da utilização desse sistema é a possibilidade de trabalhar com amostras que possuem turbidez, altamente coloridas e com suspensões. As desvantagens incluem a baixa reprodutibilidade e a validade do eletrodo.

No processo de produção do TNT, além de água para sua purificação, emprega-se também uma solução de sulfito de sódio (Na_2SO_3) para remoção das formas assimétricas do TNT

(RODRIGUES, 2005). Alsop et al. (1980) determinaram a CE50 dessa substância pura, que foi igual a 2000 mg/L, utilizando culturas mistas de microrganismos isolados do lodo de estações de tratamento de esgotos. Slabbert (1986) encontrou CE50 de 1,05 mg/L para o fenol, utilizando *P. putida*.

Bringman e Kuhn (1977) apud Ryon (1984) testaram *P. putida* utilizando inibição do crescimento como indicador de toxicidade. Encontraram efeitos em níveis de 9,0 mg/L para o 2,3DNT, 26 mg/L para o 2,6DNT, 57 mg/L para 2,4DNT e > 100 mg/L para o TNT.

Duque et al. (1983) relataram a existência de uma cepa de *Pseudomonas* capaz de utilizar o TNT como fonte de nitrogênio para o seu crescimento, a partir do solo próximo a uma fábrica de explosivos..

Os resultados apresentados no atual estudo mostram a eficiência da bactéria *P. putida* em avaliar a toxicidade dos efluentes da produção do TNT. No entanto, a maioria dos trabalhos encontrados indicam que cepas deste microrganismo são capazes de degradar o TNT ao invés de sofrer efeitos tóxicos com a sua presença.

5.3.3.2 Efluentes da produção da Nitrocelulose

Os resultados da exposição de *P. putida* aos efluentes da nitração podem ser vistos na Figura 14. O efluente da mistura mostrou que para as concentrações máximas testadas de 87,3 e 50% não houve qualquer inibição do crescimento bacteriano. O efluente do branqueamento foi o único que causou inibição na concentração de 73,11%. Conforme mencionado anteriormente, *P. putida* é uma bactéria Gram-negativa que tem demonstrado capacidade de ser utilizada para degradação de compostos como o TNT. Até o momento, não foram encontrados estudos que abordassem sua capacidade de degradar a nitrocelulose.

Contudo, o que se nota é que este microrganismo não foi sensível aos efluentes avaliados, o que poderia ser atribuído à: falta de sensibilidade da cepa testada (ATCC15175), existência de mecanismos nos organismos que impediram a ação tóxica desses compostos ou utilização do N presente no meio como fonte de nutrientes para o seu desenvolvimento. Há relatos de alguns autores de que esse consumo de nutrientes ocorreria na forma de cometabolismo, ou seja, algum outro nutriente presente no meio de cultivo favoreceria o consumo de N por *P. putida* (GELLERT, 2000)

Como mencionado anteriormente, a toxicidade dos efluentes da produção de polpa e papel pode estar ligada à presença de ácidos resinosos ou extrativos gerais nos mesmos. Wilson et al. (1996) isolaram duas cepas de *Pseudomonas* que poderiam crescer nos ácidos pimárico e deidroabiético, e uma delas também podia crescer no ácido abiético. Durante o crescimento, ambas as cepas transformaram o carbono derivado do ácido isopimárico em quantidades iguais de biomassa, dióxido de carbono e carbono orgânico dissolvido.

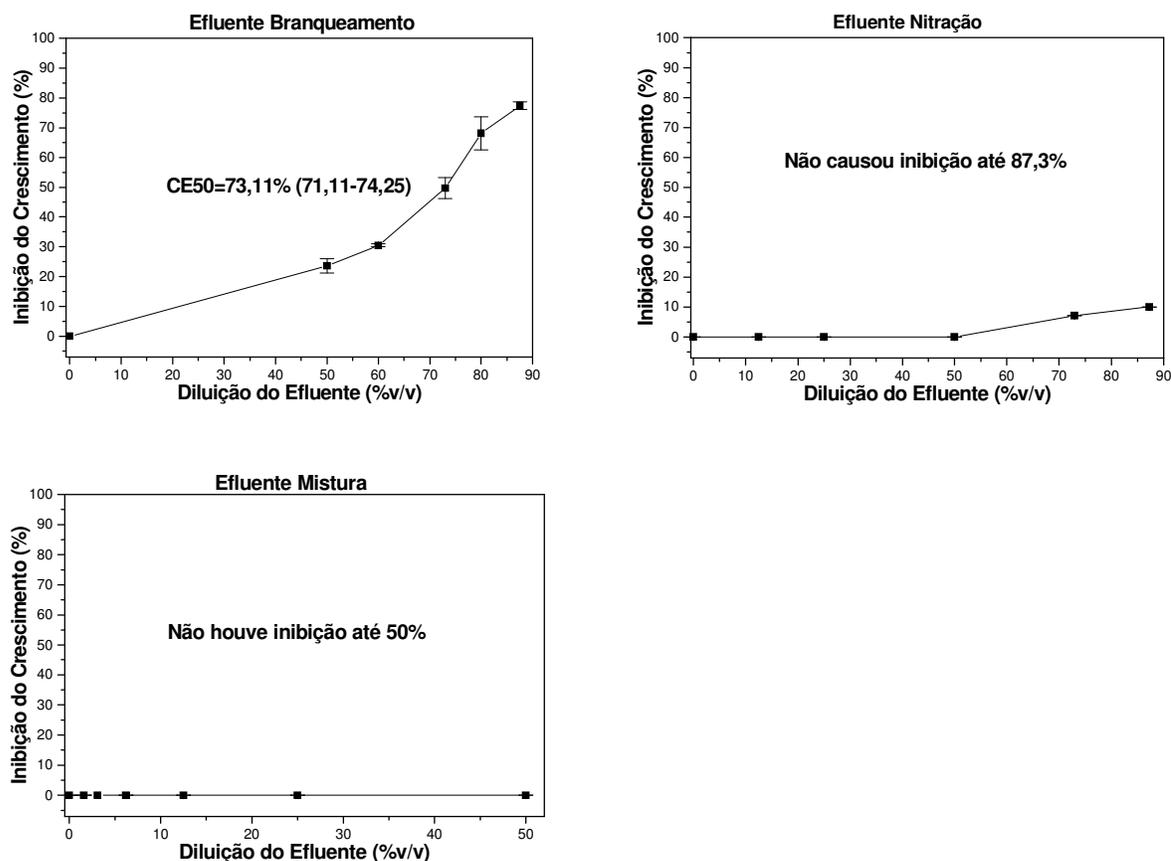


Figura 14 – Inibição (%) de crescimento de *P. putida* obtido nos ensaios de toxicidade aguda com valores de CE50 6 h e respectivos intervalos de confiança para efluentes do branqueamento, nitração e mistura (deslignificação + branqueamento + nitração) proporção de 1:1:1. Ensaio realizado de agosto a setembro de 2006.

Slabbert (1988), avaliou a inibição do crescimento de *P. putida* pela técnica de unidades formadoras de colônia (UFC), encontrando valores de CE50 igual a 4.256 mg/L para o fenol.

Farré e Barceló (2001) utilizaram uma metodologia que avalia a inibição da bactéria *P. putida* immobilizada em um eletrodo descartável, para determinar a CE50 do pentaclorofenol. O resultado obtido pelos autores foi CE50 de 320 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$.

Slabbert e Venter (1999) determinaram a toxicidade dos efluentes de uma indústria de papel, antes e após tratamento, para vários organismos dentre eles *P. putida*. Conforme os resultados obtidos, o efluente final tratado da indústria foi capaz de causar 71% de inibição bacteriana. Dos ensaios realizados no referido efluente, *P. putida* foi um dos três organismos que apresentaram resultados positivos, sendo considerado o teste mais sensível de todos os que foram utilizados.

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que os efluentes da produção de nitrocelulose, parecem não ter causado efeitos tóxicos significativos sobre a bactéria *P. putida*.

5.3.4 *Danio rerio* (Paulistinha)

5.3.4.1 Efluentes da produção do TNT

Baseado nos testes de toxicidade aguda realizados com os efluentes da produção do TNT para o peixe *Danio rerio*, observa-se que todos os efluentes avaliados (apesar de muito diluídos) foram extremamente tóxicos ao peixe. A AV e a mistura AA+AV produziram uma CL50 de 0,35% 0,74%, respectivamente; a AA CL50 de 0,47%, Figura 15.

Nas Tabelas 23 a 25, são apresentados os dados do monitoramento de alguns parâmetros durante o ensaio com peixes. De forma geral, durante os ensaios, os valores de pH das soluções-teste não sofreram grandes variações, com algumas exceções, ensaio com a AA+AV. Em todos os efluentes avaliados da produção do TNT, a faixa de variação do pH ficou de acordo com o que preconizado pela NBR 15088/04, que é entre 5,0 a 9,0.

Para os efluentes analisados, o parâmetro de condutividade sofreu pouca variação. Da mesma forma, para o oxigênio dissolvido, em algumas concentrações dos efluentes, houve decréscimo desse valor, em outras, elevação. No entanto, a variabilidade foi pequena. O oxigênio dissolvido, exceto em algumas concentrações dos efluentes da AV e AA+AV. Todavia, conforme recomendado pela NBR 15088/04, os valores de oxigênio dissolvido não foram inferiores à 4,0 mg/L.

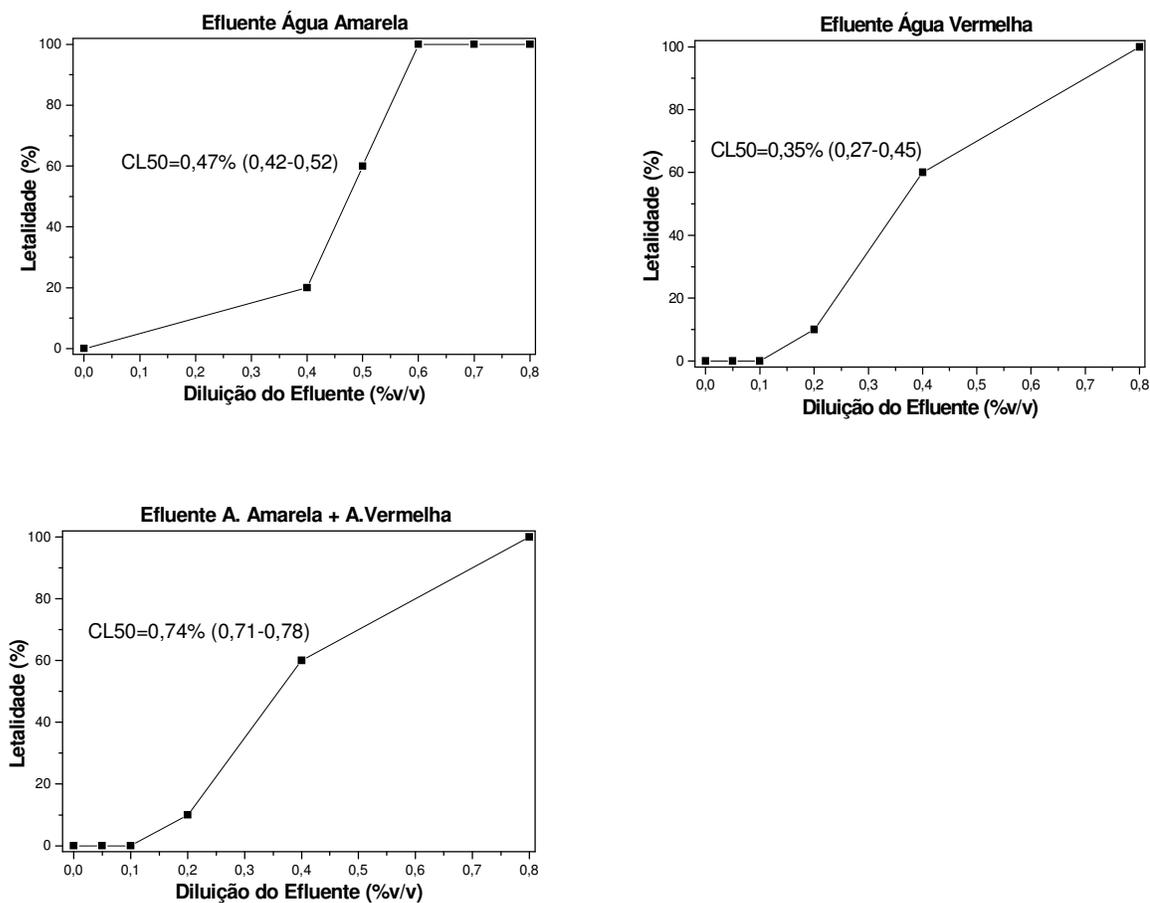


Figura 15 - Letalidade (%) de *D. rerio* obtido nos ensaios de toxicidade aguda com valores de CL50 48 h e respectivos intervalos de confiança para efluentes da produção de TNT: AA, AV, AA+AV. Ensaios realizados no período de abril a junho de 2007.

Tabela 23 - Resultados da determinação dos parâmetros físico-químicos (pH, condutividade, e OD inicial e final) realizados durante os ensaios de toxicidade aguda com *D. rerio* para o efluente da água amarela.

Efluente (%)	pH		Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$)		OD (mg/L)	
	<i>i</i>	<i>f</i>	<i>i</i>	<i>f</i>	<i>i</i>	<i>f</i>
controle	7,00	7,10	156,0	155,6	7,4	7,1
0,4	7,20	7,30	244,0	236,1	7,7	7,3
0,5	7,20	7,10	273,3	274,0	7,9	7,1
0,6	7,20	7,00	291,1	306,0	7,6	7,0
0,7	7,20	7,00	308,0	330,0	7,6	7,0
0,8	7,20	7,06	341,4	365,6	7,6	6,8

i: inicial; *f*: final

Tabela 24 - Resultados da determinação dos parâmetros físico-químicos (pH, condutividade, e OD inicial e final) realizados durante os ensaios de toxicidade aguda com *D. rerio* para o efluente da água vermelha.

Efluente (%)	pH		Condutividade ($\mu\text{S/cm}$)		OD (mg/L)		
	AV	<i>i</i>	<i>f</i>	<i>i</i>	<i>f</i>	<i>i</i>	<i>f</i>
controle		7,00	7,10	156,8	155,6	7,4	6,5
0,05		7,50	7,20	169,8	176,7	8,5	6,5
0,1		7,30	7,20	180,1	204,1	8,1	6,7
0,2		7,50	7,20	204,4	277,6	8,2	5,0
0,4		7,30	7,00	260,0	300,7	7,8	4,8
0,8		7,30	6,70	360,5	340,8	7,7	4,3

i: inicial; *f*: final

Tabela 25 - Resultados da determinação dos parâmetros físico-químicos (pH, condutividade, e OD inicial e final) realizados durante os ensaios de toxicidade aguda com *D. rerio* para o efluente da mistura da água amarela com água vermelha.

Efluente (%)	pH		Condutividade ($\mu\text{S/cm}$)		OD (mg/L)		
	AA + AV	<i>i</i>	<i>f</i>	<i>i</i>	<i>f</i>	<i>i</i>	<i>f</i>
controle		7,00	7,24	151,3	134,5	8,6	6,3
0,5		7,14	7,42	252,0	242,0	7,7	6,0
0,6		7,25	7,3	280,0	265,0	8,4	5,9
0,7		7,20	7,51	303,5	345,3	8,5	5,8
0,8		7,10	7,76	331,6	334,6	8,3	5,0
0,9		7,24	7,49	339,5	194,8	8,4	4,7

i: inicial; *f*: final

Liu et al. (1983) utilizaram quatro espécies de peixes para avaliar a toxicidade do TNT (solução 90 mg/L) e das águas residuárias de diferentes origens, com teores de (37 mg/L TNT e 23 mg/L de RDX) provenientes de uma indústria de munições. A CL50 96 h para os peixes utilizados no estudo com efluentes foram: “Fathead minnow” (CL50= 2,9 mg/L), “Channel catfish” (CL50=2,4 mg/L), “Bluegill sunfish” (CL50=2,6 mg/L) e “Rainbow trout” (LC50=0,8 mg/L). Todas as espécies-teste demonstraram ter sofrido efeitos tóxicos com TNT e as águas residuárias testadas. No presente estudo, as águas residuárias da produção do TNT também foram tóxicas ao peixe *D. rerio*.

Além da determinação da toxicidade, Liu et al. (1983) também observaram que alguns dos peixes expostos às concentrações de TNT e de outros efluentes que causaram a morte desses organismos, desenvolveram lesões hemorrágicas logo abaixo da nadadeira dorsal. Essas lesões foram internas e próximas à coluna vertebral. Esses autores também observaram alterações comportamentais como apatia, perda de equilíbrio e alterações do nado.

Yoo et al. (2006) expuseram larvas do peixe *Pimephales promelas* a varias concentrações do 2,4,6-Trinitrotolueno 0,1-10 mg/L e 1,0-5,0 mg/L em experimentos de 4 e 10 dias, respectivamente. A concentração letal mediana observada foi 2,7 mg/L e 2,20 mg/L para 4 e 10 dias, respectivamente. Além da toxicidade ao peixe, esse estudo demonstrou baixo potencial de bioacumulação e rápida degradação do TNT no peixe estudado. A presença de produtos de degradação em tecidos do peixe foi detectada após 10 min de exposição do TNT, indicando aque ele é rapidamente metabolizado pelo peixe.

Para Burton et al. (1993), o pH e a dureza da água parecem não afetar a toxicidade do TNT aos peixes. O TNT é sensivelmente menos tóxico aos peixes em baixas temperaturas do que em altas. Pearson et al. (1979) utilizaram “fathead minnows” em um ensaio com uma mistura complexa de efluentes industriais. Os autores encontraram CL50 igual a 2,4 mg/L para o TNT, em um teste estático com 96 h de duração. Utilizando *P. promelas* foi encontrada uma faixa de valores de CL50 96 h entre 1,2 a 2,58 mg/L.

Smock et al. (1976) reportaram CE50 96 h de 0,46 mg/L para o peixe *P. promelas* exposto até 44,9 mg/L⁻¹. As respostas de alteração comportamental consistiram em choque (busca de oxigênio na superfície do recipiente e letargia) seguido de falta de controle motor. A concentração de 0,05 mg/L não produziu nenhuma alteração comportamental.

Van de Schalie (1983) determinou a toxicidade de alguns compostos formados durante a produção contínua do TNT: 3,5-dinitroanilina, 1,3-dinitrobenzeno e 1,3,5-trinitrobenzeno. Foram utilizadas quatro espécies de peixes: “fathead minnow”, truta arco-íris, “channel catfish” e “bluegill”. Para o primeiro composto a CL50 96 h variou de 2,99 a 21,2 mg/L para a truta arco-íris e fathead minnow, espécies mais e menos sensíveis, respectivamente. Para o 1,3-dinitrobenzeno os valores de CL50 96 h obtidos foram de 1,44 a 16,8 mg/L para bluegill e fathead minnow, espécies mais e menos sensíveis respectivamente. Por último, para o 1,3,5-trinitrobenzeno as CL50 96 h obtidas foram de 0,38 e 0,85 mg/L para “channel catfish” e “bluegill”, espécies mais e menos sensíveis, respectivamente.

Os trabalhos apresentados demonstraram toxicidade do TNT (substância pura), metabólitos e águas residuárias a várias espécies de peixes, corroborando os resultados encontrados de toxicidade dos efluentes do TNT ao peixe *D. rerio*.

5.3.4.2 Efluentes da produção da nitrocelulose

Os resultados obtidos com a exposição de *D. rerio* aos efluentes da produção e nitrocelulose podem ser vistos na Figura 16.

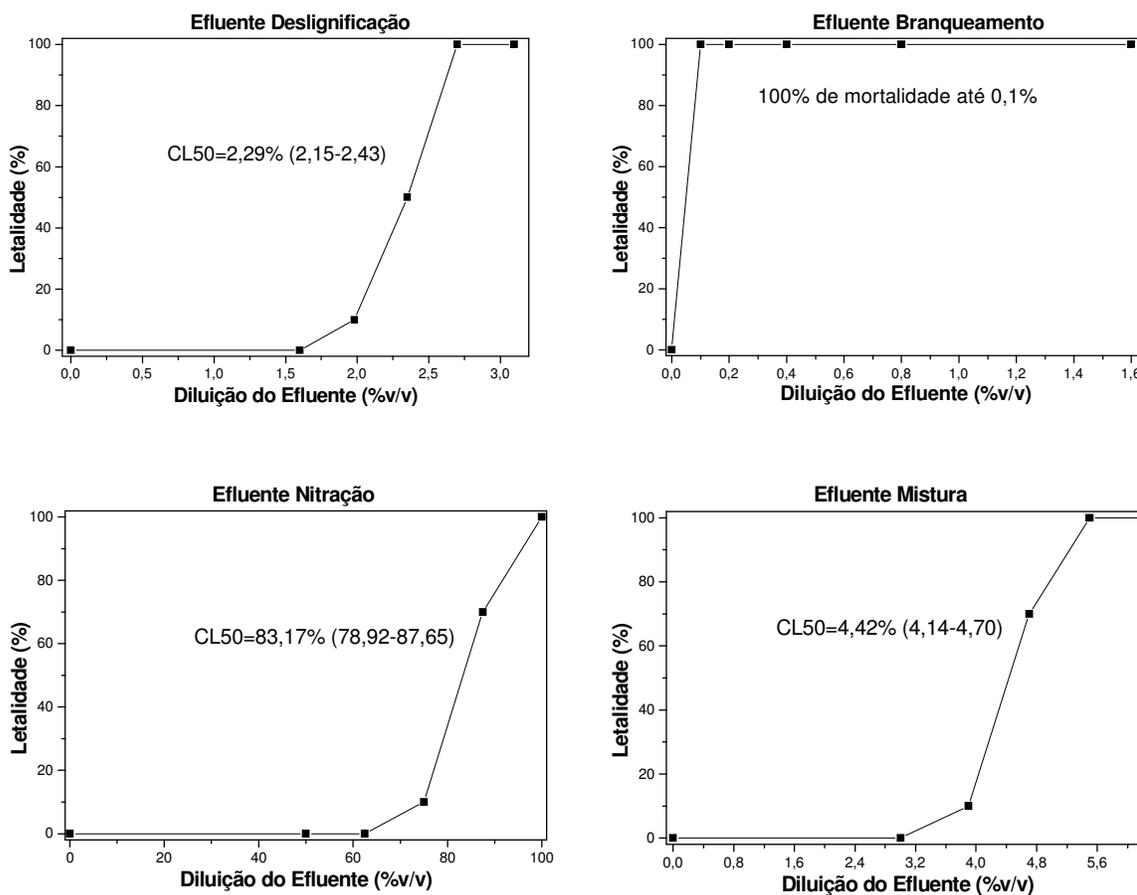


Figura 16 - Letalidade (%) de *D. rerio* obtido nos ensaios de toxicidade aguda com valores de CL50 48 h e respectivos intervalos de confiança para efluentes da produção de nitrocelulose: deslignificação, branqueamento, nitração e mistura dos efluentes. Ensaio realizado no período de abril a junho de 2007.

O efluente da deslignificação diluído a 2,29% foi capaz de causar letalidade a 50% dos peixes expostos. O efluente do branqueamento causou 100% de mortalidade até a concentração testada de 0,1%. Os valores de CL50 dos efluentes da nitração e da mistura foram iguais a 83,17% e 4,42%, respectivamente.

Nas Tabelas 26 a 29 são apresentados os dados do monitoramento de alguns parâmetros durante o ensaio. No geral, durante a realização dos ensaios o pH, das soluções-teste não sofreu grandes variações. Em todos os efluentes a variação do pH inicial para o final foi

pequena. Em todos os efluentes avaliados, da produção de nitrocelulose, a faixa de variação do pH atendeu o que é preconizado pela NBR 15088/04, que é de 5,0 a 9,0.

Para os efluentes analisados, a condutividade sofreu pouca variação, aumentando conforme a concentração dos efluentes do início para o final do teste. Em alguns casos houve redução do valor da condutividade do início para o fim do teste, como para o efluente da mistura. O oxigênio dissolvido ficou bastante reduzido nas concentrações mais elevadas dos efluentes da deslignificação, nitrificação e mistura, chegando à níveis próximos de zero. Essas reduções indicam a presença de substâncias redutoras nos efluentes. Nessas concentrações os peixes morreram 1 a 2 h após o início do teste. Conforme recomendado pela NBR 15088/04, os valores de oxigênio dissolvido não devem ser inferiores à 4,0 mg/L.

Tabela 26- Resultados da determinação dos parâmetros físico-químicos (pH, condutividade, e OD inicial e final) realizados durante os ensaios de toxicidade aguda com *D. rerio* para o efluente da deslignificação.

Efluente (%)	pH		Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$)		OD (mg/L)	
	<i>i</i>	<i>f</i>	<i>i</i>	<i>f</i>	<i>i</i>	<i>f</i>
controle	7,11	7,25	141,0	165,0	8,3	6,7
1,6	7,38	7,46	781,0	896,0	7,6	5,3
1,98	7,46	7,51	928,0	1.057,0	7,6	5,1
2,35	7,45	7,35	1.088,0	1.252,0	7,4	6,6
2,7	7,44	7,29	1.242,0	1.438,0	7,8	00,4
3,1	7,4	7,31	1.385,0	1.578,0	7,4	00,4

i: inicial; *f*: final

Tabela 27 - Resultados da determinação dos parâmetros físico-químicos (pH, condutividade, e OD inicial e final) realizados durante os ensaios de toxicidade aguda com *D. rerio* para o efluente do branqueamento.

Efluente (%)	pH		Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$)		OD (mg/L)	
	<i>i</i>	<i>f</i>	<i>i</i>	<i>f</i>	<i>i</i>	<i>f</i>
controle	7,3	7,25	156,5	165,0	7,7	6,7
0,1	7,4	7,81	164,4	168,7	7,9	8,6
0,2	7,36	7,59	181,4	198,3	8,1	8,5
0,4	7,38	7,35	222,4	232,8	8,2	8,5
0,8	7,41	7,29	281,5	292,3	8,2	8,5
1,6	7,45	7,11	403,8	416,8	8,1	8,1
3,1	7,45	6,98	637,0	665,3	8,2	8,2

i: inicial; *f*: final

Tabela 28 - Resultados da determinação dos parâmetros físico-químicos (pH, condutividade em mili Simens e OD inicial e final) realizados durante os ensaios de toxicidade aguda com *D. rerio* para o efluente da nitrificação.

Efluente (%)	pH		Condutividade (mS/cm)		OD (mg/L)	
	<i>i</i>	<i>f</i>	<i>i</i>	<i>f</i>	<i>i</i>	<i>f</i>
controle	7,21	7,30	0,158	0,170	8,7	6,8
50,0	7,22	7,51	7,169	7,418	8,3	5,3
62,5	7,17	7,17	8,967	9,397	7,9	5,1
75,0	7,16	7,00	10,40	10,84	7,7	6,6
87,5	7,21	7,30	12,02	19,98	7,5	00,4
100	7,21	7,40	13,28	≥ 20,0	7,2	00,4

i: inicial; *f*: final

Tabela 29 - Resultados da determinação dos parâmetros físico-químicos (pH, condutividade, e OD inicial e final) realizados durante os ensaios de toxicidade aguda com *D. rerio* para o efluente da mistura.

Efluente (%)	pH		Condutividade (µs/cm)		OD (mg/L)	
	<i>i</i>	<i>f</i>	<i>i</i>	<i>f</i>	<i>i</i>	<i>f</i>
controle	7,00	7,24	151,3	134,5	8,6	6,3
3,1	7,28	7,30	730,5	667,0	8,5	3,0
3,9	7,24	7,51	912,3	827,0	8,4	2,1
4,7	7,25	7,76	1.070,0	979,6	8,3	00,5
5,5	7,33	7,49	1.285,0	1.127,0	8,1	00,4
6,2	7,34	8,07	1.379,0	1.217,0	7,9	00,3

i: inicial; *f*: final

Vetrano (2001) relata que os peixes exibem resposta à toxicidade do cloro e dos produtos de reação do cloro. Essa resposta está relacionada a uma alteração no comportamento dos mesmos, alterações no nado, movimento opercular, respiração e desorientação em concentrações agudamente tóxicas.

Em outro estudo esse autor expôs peixes a 0,11 mg/L e 0,22 mg/L de cloro por 2 h, seguido de 6 h em água desclorada. Eles observaram que os peixes utilizados no experimento tiveram hemorragia subcutânea e elimaram sangue pela boca com aumento da dose. As taxas de ventilação pulmonar diminuíram com aumento da concentração de cloro. Na concentração de 0,22 mg/L de cloro, os peixes morreram após 2 h de exposição. Os peixes afetados, mas vivos, subiram para a borda do tanque indicando sinal de hipóxia.

Riva e López (2001) avaliaram o impacto do lançamento de efluentes do branqueamento do algodão com hipoclorito de sódio utilizando ensaios de toxicidade com quatro espécies de

organismos: *D. rerio*, *Carassius sp*, *S. subspicatus* e *P. phosphoreum*. A CL50 dos efluentes antes do tratamento foram 4,98% e 5,94% para *D. rerio* e *Carassius sp*, respectivamente. Após o tratamento dos efluentes, o valor da CL50 ficou próximo a 18% para ambos os organismos.

Magalhães et al. (2007) avaliaram o comportamento do peixe *D. rerio* exposto a concentrações subletais de hipoclorito de sódio usando um sistema de análise de biomonitoramento por imagem. Primeiro determinaram a variação normal do nado dos peixes em um grupo controle e depois a CL50 (24 h) dos peixes expostos ao NaClO. Para avaliar os efeitos tóxicos dessa substância, os autores expuseram *D. rerio* a várias concentrações menores que a CL50 determinada. Duas respostas principais foram observadas: um comportamento de escape (aumento da atividade de nado) em 10% da CL50 do hipoclorito e um gradual decréscimo na atividade de nado, a partir da concentração de 20% da CL50 determinada.

É preciso considerar que diluições inferiores a CL50 podem causar a morte dos organismos em períodos superiores às 48 h do teste. Após o final dos ensaios os peixes mortos foram separados, as soluções-teste armazenadas para descarte e os peixes vivos remanescentes colocados em um aquário. Desses, vários morreram na primeira semana após o ensaio.

Nos testes com o efluente do branqueamento ocorreram mortes dos peixes nas maiores concentrações testadas em 1h de teste, em 24 h todos já estavam mortos. O efluente da deslignificação possui coloração muito forte. Alguns peixes sobreviventes à dose letal, absorveram a cor do efluente e durante uma semana aproximadamente, após o teste, foram liberando essa coloração que se incorporou à água do aquário, tornando-a turva e avermelhada.

O valor da CL50 24 h determinado por Magalhães et al. (2007) para o NaClO foi de 48mg/L. Segundo Santos (2006) o efluente de branqueamento aqui estudado possui cloro residual igual a 1.600 ± 200 mg/L. Essa concentração tão elevada de cloro pode ser uma causa provável de não se conseguir determinar a CL50 do efluente de branqueamento aqui estudado, pois mesmo em concentrações de 0,1% todos os peixes morreram.

Sepúlveda et al. (2002) demonstraram haver alterações reprodutivas em peixes coletados num rio nas proximidades do lançamento de efluentes de uma indústria de papel e celulose. Trabalhos desse tipo confirmam o efeito tóxico dos efluentes de indústrias como a de papel e de nitrocelulose em virtude dos compostos por elas apresentados.

Bentley et al. (1977) realizaram um estudo com vários macroinvertebrados e espécies de peixes utilizando resíduos de um tanque de nitrocelulose, de uma fábrica de munições, com 11,8% de celulose ativa. As espécies de peixes: *Lepomis macrochirus*, *Salmo gairdneri*, *Ictalurus punctatus* e *Pimephales promelas* foram expostos a concentrações de 0, 560, 750 e 1000 mg/L. Até a concentração de 1000 mg/L não foi observado efeito de 50% de letalidade para os peixes.

Em outro estudo realizado por Bentley et al. (1977) foram testados vários estágios de vida do peixe *P. promelas* (1 h a 60 dias), para os efeitos tóxicos da nitrocelulose, e o impacto de diversas variáveis de qualidade das águas (diferentes faixas - temperatura, dureza, pH) ao *L. macrochirus*. Nenhum efeito tóxico foi encontrado para os organismos testados.

Os ácidos resinosos são componentes da madeira mole, principalmente, que também estão presentes no algodão, matéria prima da produção de nitrocelulose. Segundo Oikari et al. (1983) e Liss et al. (1997) eses ácidos resinosos são altamente tóxicos para os peixes e tornam-se consideravelmente mais tóxicos quando são clorados na etapa de branqueamento da polpa da madeira durante a fabricação do papel. Quando os materiais residuários da fabricação do papel são liberados no ambiente aquático, os peixes podem exibir uma variedade de sintomas, incluindo danos ao sistema nervoso e eventualmente morte.

Liss et al. (1997) relataram que os ácidos resinosos naturais e seus produtos de transformação podem acumular em sedimentos e causar toxicidade aguda e crônica aos peixes. Vários compostos de biotransformação dos ácidos resinosos mostraram ser bioacumulativos e mais resistentes à biodegradação do que o composto original.

Lee et al. (1990) reportaram que os ácidos resinosos, e em menor escala, os ácidos graxos insaturados encontrados em efluentes de polpação da madeira, têm sido apontados como maiores contribuidores de toxicidade desses efluentes aos peixes.

De acordo com os dados de toxicidade aguda levantados por Rigol et al. (2003), para determinação da CL50 96 h de diversos ácidos resinosos, utilizando truta arco-íris e salmão, os ácidos abiético e deidroabiético foram os menos tóxicos, CL50 entre 0,7-1,5 mg/L e 0,8-1,7 mg/L. O ácido isopimárico foi um dos mais tóxicos, CL50 entre 0,4-1,0 mg/L.

Segundo Liss (1997), a baixa solubilidade aquosa dos ácidos resinosos afeta sua distribuição, transporte e biodisponibilidade em sistemas de tratamento de efluentes. Essa propriedade pode afetar também a toxicidade. A toxicidade dos ácidos resinosos para peixes varia com a proporção dos ácidos em estado ionizado. Os derivados dos ácidos deidroabiéticos clorados são mais hidrofóbicos e têm mostrado ser biologicamente

recalcitrantes e mais tóxicos do que os derivados não clorados. Isso indica que a solubilidade é um importante fator na determinação da toxicidade global dos efluentes.

Zanella (1983) observou que os valores da CL50 96 h para o ácido deidroabiético diminuíram com o aumento do pH, sugerindo que a forma ionizada do ácido abiético foi menos tóxica do que a forma não dissociada.

Muitos outros fatores podem causar a morte dos organismos em bioensaios. Dentre eles o pH e o teor de oxigênio dissolvido. Segundo Environment Canada (1991), pesquisadores e a literatura têm mostrado que, em geral, a redução do oxigênio dissolvido de 100 para 80% do nível de saturação do ar pode causar a mortalidade de peixes expostos a alguns contaminantes gerados pelas indústrias de papel, que utilizam o cloro como agente branqueador.

Os dados obtidos no presente trabalho demonstram toxicidade no efluente da nitratação. No entanto, o mesmo só causou efeito em concentrações de 83,17%. Em comparação com os demais efluentes da produção de nitrocelulose, este efluente foi o menos tóxico e o do branqueamento, o mais tóxico.

5.4 Testes de Toxicidade Crônica

5.4.1 *Pseudokirchneriella subcaptata*

5.4.1.1 Efluentes da Produção de TNT

A avaliação da toxicidade crônica dos efluentes da produção do TNT com a alga *Pseudokirchneriella subcaptata* são apresentados na Figura 17.

O efluente da AA apresentou CENO de 0,2% enquanto que o da AV e da AA+AV apresentaram valores de CENO igual a 0,10%. Os valores de CEO foram 0,4% para o efluente da AA e 0,20% para os efluentes da AV, AA+AV. De acordo com esses resultados pode-se dizer que os efluentes do TNT possuem toxicidade crônica. Assim como no caso dos efluentes da produção de nitrocelulose, os resultados obtidos com os efluentes da produção do TNT também foram capazes de inibir o crescimento das algas em concentrações muito pequenas. Tal fato pode refletir a interferência da coloração dos efluentes à passagem da luz e realização de fotossíntese pelas algas ou presença de compostos muito tóxicos.

Durante a realização dos ensaios, tanto para os efluentes da produção de nitrocelulose como do TNT, houve variação no pH das soluções-teste e do controle de 7,5-7,8 no início do teste, até valores máximos de 10,5 ao final das 96 h de teste. Estes dados podem ser correlacionados com o crescimento algáceo, pois na medida em que havia aumento do número de algas, o pH também aumentava (dados em anexo).

Reginato (1998) relata que um aumento do pH do meio pode ser observado quando a suplementação de CO_2 , proveniente da atmosfera, for insuficiente e a alga recorrer ao NHCO_3 ou Na_2CO_3 disponíveis no meio como fonte de CO_2 .

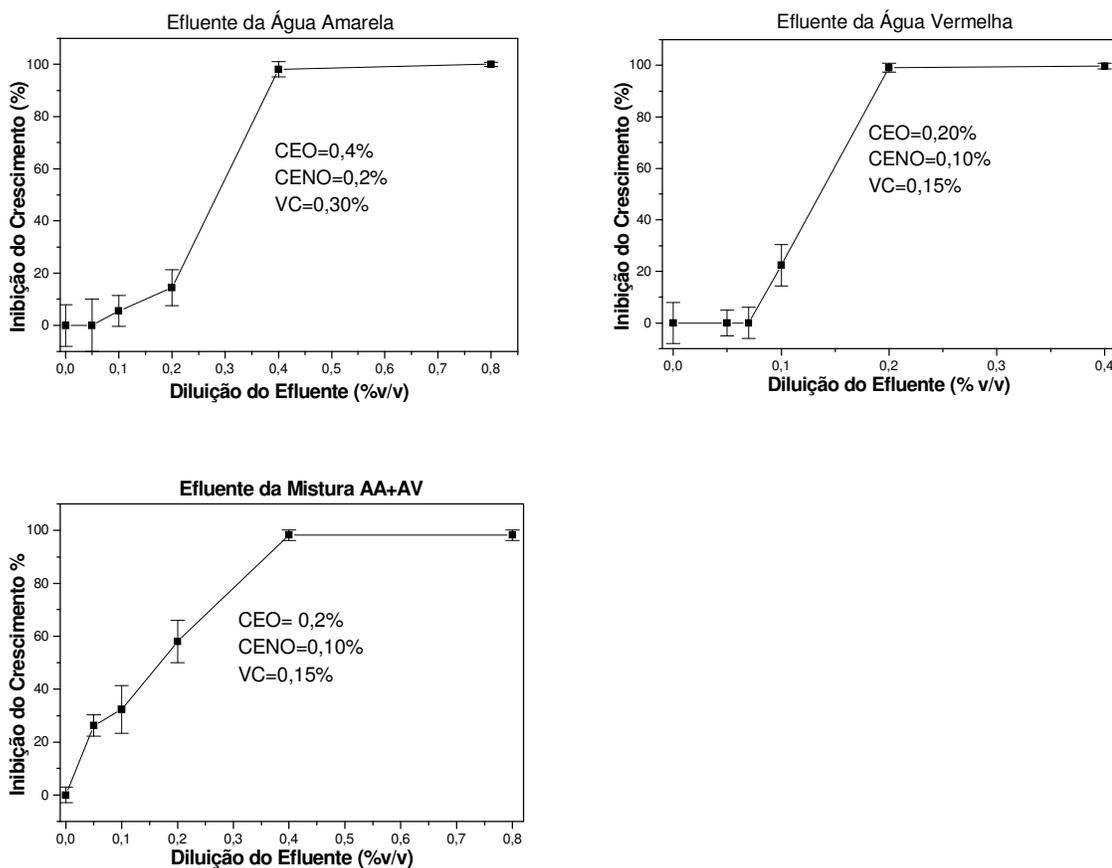


Figura 17 – Inibição (%) do crescimento de *P. subcaptata* 96 h nos ensaios de toxicidade crônica com amostras dos efluentes da produção de TNT: AA, AV e AA+AV na proporção de 77 e 23 % respectivamente, realizados durante o mês de outubro de 2005.

Comber et al. (1995) afirmaram que as mudanças de pH determinadas durante os testes podem ocorrer em razão da alta densidade de células algais aliado às altas taxas de crescimento. Devido à escassez de trabalhos publicados com efluentes originados na produção do TNT, as comparações de toxicidade foram realizadas com publicações que abordavam a toxicidade do TNT (substância pura).

Dodard et al. (1999) examinaram os efeitos tóxicos do 2,4-DNT, 2,6-DNT, bem como alguns de seus respectivos metabólitos, que foram examinados e comparados com o TNT, usando os testes Microtox (*Vibrio fischeri*) e o teste de inibição de crescimento 96 h com a alga *S. capricornutum*. Todos os compostos testados foram menos tóxicos do que o TNT.

A água vermelha gerada durante um estágio de purificação do TNT é rica em DNT sulfonados. A mistura da água amarela + água vermelha na proporção de 77 e 23% respectivamente, teve seu valor de CENO igual ao da água vermelha (0,10%), apesar da água amarela estar em maiores proporções.

Smock et al. (1976) avaliaram a toxicidade do α -TNT e do seu produto de degradação primária TNTcc, comumente referido como "pink water" frente a dois organismos de níveis tróficos diferentes. Em nível de produtores primários foram usadas as algas *Selenastrum capricornutum* (*Pseudokirchneriella subcaptata*) e *Microcystis aeruginosa*. O α -TNT em concentrações $\geq 5 \text{ mg L}^{-1}$ inibiu o crescimento da alga *S. capricornutum* (*Pseudokirchneriella subcaptata*), mas o efeito desapareceu após 17 dias. Para *M. aeruginosa* só houve efeitos de inibição do crescimento na concentração de 50 mg/L. TNTcc inibiu o crescimento de *S. capricornutum* (*Pseudokirchneriella subcaptata*) acima de 9 mg L^{-1} e foi letal a *M. aeruginosa* na concentração de 50 mg L^{-1} , no entanto, estimulou o seu crescimento em baixas concentrações.

Para Burton et al. (1993) a toxicidade do TNT estimada para ensaios com algas é questionável porque muitos desses ensaios são conduzidos, utilizando iluminação contínua e não possuem sistema de renovação da solução-teste, podendo ocorrer fotólise da solução original contendo TNT. A partir disso, os autores acima referidos realizaram um teste de fitotoxicidade com *Lemna minor*, com renovação diária da solução-teste, e evitando assim eventual fotólise da solução-teste.

Liu et al. (1983) observaram que durante o ensaio de toxicidade com algas, utilizando TNT e efluentes como amostras, houve mudança na coloração da solução-teste, que passou a ser de um vermelho amarronsado, indicando fotólise do TNT.

Won et al. (1976) expuseram a alga *S. capricornutum* (*Pseudokirchneriella subcaptata*) ao TNT por 7 dias e constataram que a concentração de 2,5 mg/L foi capaz de reduzir o crescimento da alga significativamente (44% em relação ao controle). A concentração de 10 mg/L foi letal. Liu et al. (1983) reportaram que o teor de 4,1 mg/L inibiu o crescimento de *P. subcaptata* após 4 e 14 dias de exposição.

Van de Schalie (1983) avaliou a toxicidade de três compostos DINA, DNB e TNB, formados durante a produção contínua do 2,4,6-Trinitrotolueno, utilizando a alga *P.*

subcaptata em testes com duração de 5 dias. O DNB causou efeitos tóxicos no crescimento da alga em concentrações de 0,97 mg/L, o DINA causou efeito tóxico em concentrações de 0,13 mg/L e o TNB em concentração menor que 0,10 mg/L.

Os dados obtidos no presente estudo demonstram que todos os efluentes da produção do TNT possuem toxicidade crônica para a alga *P. subcaptata*. Além disso, a forte coloração apresentada pela AV e AA+AV podem interferir na realização de fotossíntese pelas algas.

5.4.1.2 Efluentes da Produção de Nitrocelulose

Todos os efluentes causaram inibição do crescimento da alga *P. subcaptata* 96 h para amostras dos efluentes da produção de nitrocelulose, Figura 18. Os efluentes da deslignificação e da nitrificação tiveram valores de CENO iguais a 0,1 e 50%, respectivamente. Os efluentes do branqueamento e da mistura foram os mais tóxicos, não sendo possível a determinação do CENO, pois até a concentração testada de 0,2% houve 100% de inibição do crescimento algáceo.

Diferentemente da toxicidade aguda que causa um efeito imediato de morte após a exposição do organismo ao agente tóxico, a toxicidade crônica se manifesta após a exposição a baixas doses da substância tóxica. Esses efeitos podem afetar o crescimento, reprodução e até mesmo a sobrevivência da espécie.

De acordo com os resultados obtidos para os efluentes da nitrocelulose, o que se pode observar é que, em doses muito baixa dos efluentes foram capazes de causar toxicidade crônica. Talvez devido à sensibilidade das algas aos compostos presentes nos efluentes ou, à interferência da coloração dos efluentes na penetração da luz, para realização da fotossíntese pelas algas. A primeira suposição se refere ao caso do efluente do branqueamento e a segunda, o caso dos efluentes da deslignificação e mistura, que além de serem fortemente coloridos, contém compostos tóxicos, que serão relacionados a seguir.

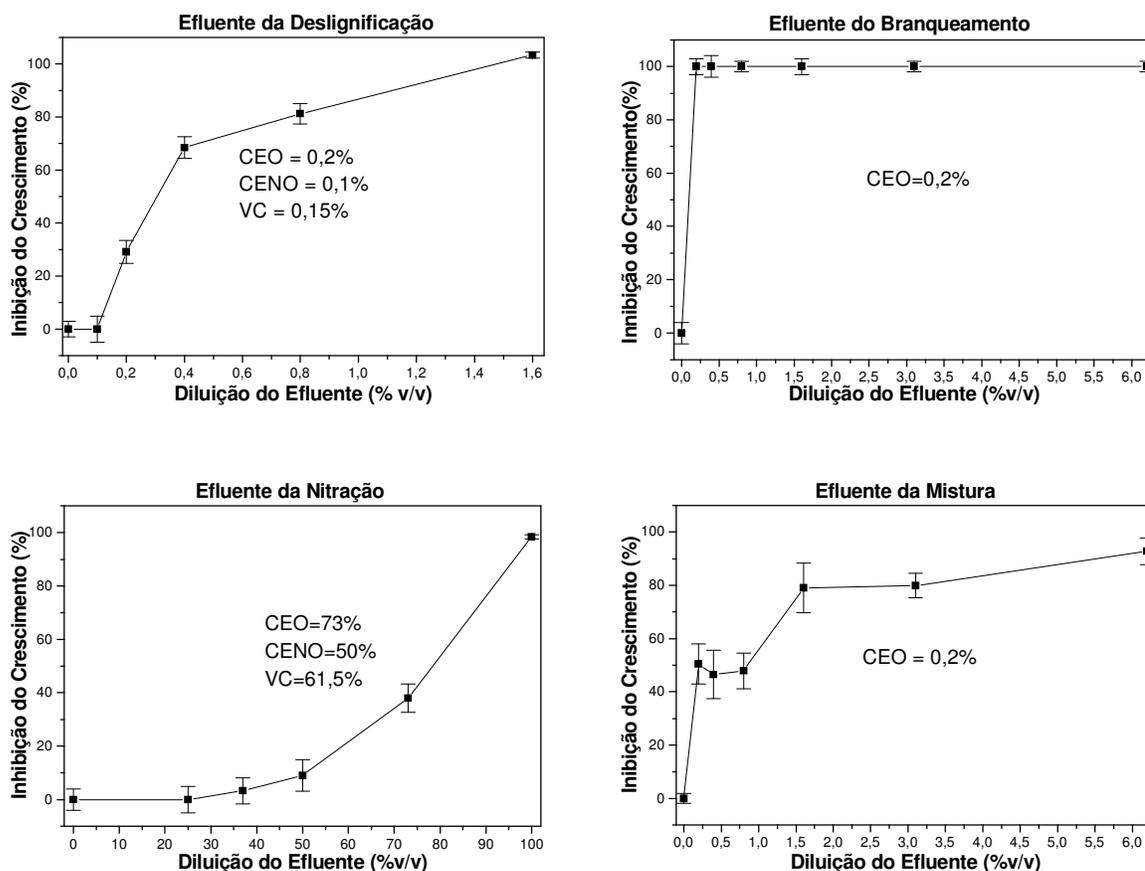


Figura 18 – Inibição (%) do crescimento de *P. subcaptata* 96 h nos ensaios de toxicidade crônica com amostras dos efluentes da produção de nitrocelulose: deslignificação, branqueamento, nitração e mistura realizados no período de outubro de 2005 a março de 2006.

Alguns efluentes têm potencial para inibir ou estimular o crescimento dos organismos aquáticos. Tanto os efeitos tóxicos como os de enriquecimento, decorrentes do lançamento de efluentes, têm poder de causar mudanças na cadeia alimentar. O efluente da nitração, apesar de causar toxicidade crônica, foi o menos tóxico de todos (CENO de 50%).

Este efluente é rico em nitrogênio, nutriente essencial ao crescimento de muitos organismos, inclusive as algas. O aporte desse nutriente, dentre outros contidos nesse efluente, em concentrações inferiores ao CENO poderia levar ao enriquecimento dos corpos receptores, causando produtividade excessiva das algas e, conseqüentemente, problemas de eutrofização nos corpos receptores.

Estudos feitos por Culp e Lowell (1999) mostraram, pela primeira vez, a natureza multivariada dos efeitos do lançamento dos efluentes de uma fábrica de polpa de celulose sobre a biota de um rio. Esses efeitos incluíram a fertilização de bactérias e algas (aumento do

crescimento) e efeitos indiretos e subseqüentes em cascata na cadeia alimentar até os níveis tróficos dos invertebrados e peixes, além do consumo direto dos efluentes (para obtenção de C, N e P) por invertebrados predadores. Falhas no tratamento dos efluentes causaram efeito tóxico na biota, como redução da abundância de chironomídeos e inibição da motilidade de moscas. Segundo Santos (2006), o teor de nitrogênio e fósforo nos efluentes da deslignificação são de 71 ± 1 e < 5 mg/L, respectivamente.

A literatura sobre impactos ecotoxicológicos dos efluentes da nitrocelulose é bastante escassa. Devido à semelhança desses efluentes com os da indústria de papel e celulose que utiliza o processo de branqueamento com cloro, dados desses trabalhos serão utilizados para comparação de resultados.

Bentley et al. (1977) expuseram 4 espécies de algas *P. subcaptata*, *Mycrocystis aeruginosa* e *Navícula pelliculosa* por 96 h a nitrocelulose e observaram um decréscimo no número de células/mL nas concentrações de 100 e 1000 mg/L, particularmente para a alga *P. subcaptata* cuja CE50 foi de 579 mg/L. Para as demais algas, os valores de CE50 foram maiores que 1000 mg/L.

Cooper et al. (1975) relataram que o lançamento de águas residuárias contendo nitrocelulose foi prejudicial ao perifiton e às comunidades algais associadas a sistemas aquáticos. Para as comunidades algais os efeitos incluíram: baixo número de indivíduos e baixa diversidade de espécies. Esses efeitos foram associados com níveis de nitrocelulose de 1 a 10 mg/L na água, embora o sedimento associado pudesse conter altos níveis de nitrocelulose.

A lignina é uma macromolécula natural presente na composição da parede celular das plantas e representa, após a celulose, a macromolécula mais abundante na natureza, com uma estrutura muito complexa (LATORRE et al. 2005). A quantidade de lignina presente em diferentes plantas é um tanto variável. Em algumas espécies de madeira o conteúdo de lignina varia de 20 a 40%. Angiospermas aquáticas e herbáceas assim como muitas monocotiledôneas são menos lignificadas (FENGEL; WEGENER, 1984). A lignina é o principal componente dos efluentes da produção de polpa e papel, assim como da polpação do algodão. A lignina é responsável pela coloração dos efluentes e a sua remoção envolve a utilização de agentes branqueadores (LATORRE et al. 2005).

Na produção de nitrocelulose a etapa de polpação alcalina é realizada com NaOH (25 g/L) para remoção de ceras, gorduras e lignina. O efluente dessa etapa também pode ser denominado lixívia e contém em torno de 10g/L de lignina, determinada como lignina Klason solúvel e insolúvel (SANTOS, 2001).

O resultado de toxicidade crônica obtido no presente trabalho, para o efluente da deslignificação (CENO=0,2%) pode estar relacionado com a alta concentração de matéria orgânica presente nesse efluente, podendo ser atribuída aos compostos de baixa massa molar, derivados da degradação da lignina e dos extrativos presentes no línter bruto.

Pillinger et al. (1994) determinaram o efeito inibitório do tanino e do ácido tânico sobre duas algas: *Chlorella* e *Mycrocystis*. Os resultados demonstraram que ambos causaram inibição no crescimento algal. A concentração de 10 mg/L de ácido tânico exerceu efeito altamente inibitório sobre as duas algas.

O efluente do branqueamento avaliado nesse trabalho apresentou elevada toxicidade, não sendo possível nem mesmo a sua quantificação. Diversos trabalhos encontrados na revisão de literatura atribuem essa toxicidade à presença de alguns compostos formados durante a etapa de branqueamento e, dos compostos remanescentes nas fibras do línter. O branqueamento da celulose é realizado com hipoclorito de sódio (NaClO) ou cloro (Cl₂). Os efluentes gerados contêm fragmentos de lignina modificados por agentes branqueadores, resultando na formação de compostos organoclorados de baixa e alta massa molar (>1000g/mol) (SANTOS, 2006; SUMATHI; HUNG, 2004).

Santos (2006) encontrou um teor de cloro residual de 1.600 ± 200 mg/L nos efluentes de branqueamento coletados na mesma indústria que forneceu amostras para este trabalho. A maior classe de compostos responsáveis por inferir toxicidade aos efluentes do branqueamento é originada durante a cloração, sendo eles: ácidos resinosos, ácidos graxos e AOX. Os dois primeiros grupos de compostos são recalcitrantes à biodegradação, assim como inibitórios aos processos anaeróbios.

Zargar e Ghosh (2007) avaliaram o impacto de diferentes temperaturas, individualmente e em conjunto, com diferentes concentrações de cloro, no crescimento da alga *Chlorella vulgaris*. O crescimento ótimo da alga foi estimado em 26°C, entretanto concentrações de cloro maiores ou iguais a 0,25mg L⁻¹ afetaram adversamente o crescimento algal nas várias temperaturas testadas.

Compostos de alta massa molar, referidos como cloroligninas, não podem ser transportados através das membranas dos seres vivos e é provável que sejam biologicamente inativos. Contudo, esses compostos possuem grande importância ambiental porque eles carregam estruturas cromóforas, que favorecem a absorção de luz nas águas. Longos períodos e baixas taxas de biodegradação podem gerar compostos de baixa massa molar, causando efeitos deletérios nos sistemas biológicos.

Os tipos de compostos clorados encontrados no líquido de branqueamento e suas concentrações dependem, por sua vez, da quantidade de lignina residual (número Kappa) na polpa, da natureza da lignina, das condições de branqueamento, como dosagem de cloro, pH, temperatura e consistência da polpa (SUMATHI; HUNG, 2004). Cerca de 500 compostos organoclorados diferentes foram identificados incluindo, clorofórmio, cloratos, ácidos resinosos, hidrocarbonos clorados, fenóis, catecóis, guaiacóis, furanos, dioxinas, seringóis, vanilinas e outros. Bajpai (2001) estima que um número menor de compostos estão presentes, aproximadamente 456 tipos, dos quais 330 são compostos organoclorados. Esses compostos podem ser classificados em três grupos principais: ácido, fenólico e neutro (FREIRE et al., 2003).

A entrada de fenóis e compostos fenólicos presentes nos efluentes da deslignificação e branqueamento da celulose em corpos aquáticos já é um problema em si. Ademais, e o outro é que, no ambiente aquático eles podem ser transformados. Segundo Boyd et al. (2001), a toxicidade dos clorofenóis está diretamente relacionada ao número de moléculas de cloro contidas no composto. Clorofenóis contendo mais moléculas de cloro possuem forte efeito inibitório nas reações de fotossíntese das algas.

Segundo Sakevich et al. (2005) os compostos fenólicos estão entre os poluentes de ecossistemas aquáticos. Além de entrar nos corpos aquáticos via efluentes, eles podem se apresentar como exometabólitos de plantas aquáticas e produtos da decomposição bacteriana da lignina, que também está presente nos efluentes da deslignificação. Monofenóis exercem efeito tóxico na atividade funcional das algas em concentrações da ordem de 750-15000 mg/L.

De acordo com esse autor, os fenóis são capazes de alterar a homeostase das células algais, o principal mecanismo de influência dos compostos fenólicos sobre as algas consiste na deterioração dos processos de oxidação e fosforilação, que resulta na deficiência de energia essencial à síntese de muitas substâncias responsáveis pelo crescimento das algas.

Uma das impurezas remanescentes da polpação alcalina e que devem ser removidas no branqueamento são os compostos fenólicos. Lee et al. (2006) examinaram a toxicidade de 16 compostos fenólicos, em função das suas propriedades físicas e químicas para a alga *P. subcaptata* e o microcrustáceo *Daphnia magna*. Os resultados mostraram que os compostos fenólicos com alto coeficiente de partição octanol-água (K_{OW}) tiveram elevada toxicidade para os organismos aquáticos. O valor da CI50 para a alga foi igual a 1,56 (μM).

Chen e Lin (2006) utilizaram um teste de toxicidade em sistema fechado com a alga *P. subcaptata* para avaliar a toxicidade do fenol e de sete clorofenóis, dentre eles o

pentaclorofenol (PCP). Os valores de CENO obtidos para o fenol e o pentaclorofenol foram de 8,19 e 0,002 mg/L, respectivamente. Esses autores concluíram que a alga *P. subcaptata* foi muito sensível aos clorofenóis, quando comparada a outros organismos aquáticos, como a bactéria luminescente (ensaio Microtox), o microcrustáceo *D. magna* e o peixe truta arco-íris.

Gellert (2000) realizou um estudo para investigar a correlação de alguns parâmetros que potencialmente indicam componentes perigosos nas águas como, AOX, COT e NT, com efeitos biológicos observados em diferentes bioensaios, dentre eles, com a alga *Scenedesmus subspicatus*. Conforme os resultados obtidos para os diversos efluentes analisados, a maior e mais freqüente ocorrência de toxicidade se deu com amostras dos efluentes que continham as mais elevadas concentrações de AOX, sendo este o parâmetro que apresentou maior correlação com a toxicidade. Dentre os organismos avaliados, o teste Microtox foi mais sensível do que o teste com alga.

Conforme estudo realizado por Riva e López (2001), os efluentes oriundos do branqueamento do algodão, com hipoclorito de sódio, foram capazes de causar toxicidade aguda, CE50 de 4,77%. Uma vez eliminado o íon OCl^- após tratamento o valor da CE50 passou a 31,86%.

O cloro é um agente químico utilizado no controle químico de microrganismos, ele é um forte agente oxidante e, em virtude dessa propriedade, é altamente reativo e destrói os componentes vitais da célula microbiana. Os hipocloritos quando adicionados à água, sofrem hidrólise, dando origem ao ácido hipocloroso. Este ácido sofre nova reação, originando o oxigênio nascente (O). Este oxigênio nascente, liberado nesta reação, é um poderoso agente oxidante que pode destruir substâncias celulares vitais. O cloro também pode combinar diretamente com proteínas celulares e destruir as suas atividades biológicas (PELCZAR JÚNIOR, 1996). Tais propriedades do cloro poderiam ser as responsáveis pela total inibição do crescimento algáceo, observado no teste realizado com o efluente do branqueamento.

Para alguns autores como Ryon (1986) e Barklei e Roseblatt (1978), os efluentes da nitração não possuem toxicidade, o maior problema é o teor de sólidos suspensos. Outro possível problema a ser causado por este efluente é a eutrofização dos corpos receptores quando o mesmo estiver em baixas concentrações.

Barklei e Roseblatt (1978) chegaram a concluir que a nitrocelulose é toxicologicamente inerte e o impacto dos seus efluentes em corpos receptores poderia ser controlado, tendo-se como critério o teor de sólidos suspensos.

Ryon (1986) concluiu que a nitrocelulose parece produzir significantes efeitos abióticos no ambiente, quando ocorre o seu lançamento. Devido a sua natureza fibrosa, a nitrocelulose

tende a cobrir o habitat bêntico, talvez privando os organismos de oxigênio e preenchendo os espaços intersticiais usados como abrigo pelos invertebrados e perifiton. Esse potencial para alteração do habitat é um componente adicional da aparente falta de degradação ambiental. Quando contrastado à baixa toxicidade do composto, essa alteração do habitat se torna um aspecto significativo para o controle regulatório.

Kotelevtsev et al. (2000), utilizando o ensaio *Salmonella*/microssoma para avaliação da mutagenicidade dos efluentes coletados após a etapa de branqueamento da polpa com cloro, detectaram atividade mutagênica no mesmo.

Yakovleva et al. (2004) estudaram a genotoxicidade de compostos da lignina, isolados das águas residuárias de uma indústria de papel e celulose após o tratamento biológico, utilizando espécies endêmicas de moluscos e milho da região de Baikal na Rússia. Os testes revelaram a toxicidade e a atividade mutagênica dos compostos da lignina, sendo que os níveis eram dependentes das características físico-químicas das substâncias da lignina, do organismo-teste e das condições experimentais. Esses resultados forneceram evidências de que esses compostos, quando despejados nos corpos aquáticos, possuem um potencial de risco genético para este ambiente.

Portanto, os efluentes da produção de nitrocelulose possuem toxicidade. Contrariamente ao que se pensava, o efluente da nitração pode causar impacto ambiental, pois o mesmo é tóxico e o seu lançamento, sem tratamento prévio, pode provocar danos no corpo receptor.

5.5 Influência de alguns parâmetros físicos nos ensaios ecotoxicológicos

5.5.1 Comparação de pH – *Daphnia similis*

Pode-se observar, nos dados apresentados na Tabela 30, que o pH original dos efluentes é extremamente básico ou ácido. Sabendo dessa condição desde a primeira coleta dos efluentes, optou-se pelo ajuste do pH das amostras no início dos testes com cada organismo para que a causa da toxicidade não fosse atribuída a esse parâmetro. No entanto, houve dúvidas se ao neutralizar o pH dos efluentes não estaria ocorrendo à geração de compostos ainda mais tóxicos. Como o trabalho já se encontrava em fase final de experimentos, foram feitos testes com a *D. similis*, por ser um organismo padronizado de resposta rápida.. Ainda assim, foram

testes preliminares, ao invés dos definitivos, com todos os efluentes estudados na tese, utilizando 10 organismos por concentração, divididos em duas replicatas.

Tabela 30 - Dados comparativos de CE50 48 h para *D. similis* com pH neutralizado e pH original das amostras dos efluentes da produção de TNT (AA, AV e AA+AV) NC (deslignificação, branqueamento, nitração e mistura). Ensaios realizados de junho a julho de 2007.

Efluentes	pH neutro	CE50-pH neutro	IC	pH inicial efluentes ¹	pH das soluções-teste ²	CE50-pH original	IC
AA	6,9	1,62%	1,36-1,94	1,0	(4,2-2,5)	100% Im.	-
AV	7,07	0,67%	0,48-0,93	8,62	(7,2-7,3)	0,48%	0,36-0,63
AA+AV	7,11	1,39%	1,08-1,79	1,58	(6,09-2,99)	100% Im.	-
Deslig.	7,31	0,47%	0,38-0,58	13,1	(10,75-8,14)	NT	-
Branq.	7,02	100% Im.*	-	9,61	(7,59-7,15)	100% Im.	-
Nitração	7,20	22,92%	18,48-28,44	0,87	(2,47-1,65)	100% Im.	-
Mistura	7,10	1,52%	1,15-2,0	12,70	(9,64-7,13)	NT.	-

*100% de Im.= houve imobilidade de todos os organismos em todas as concentrações testadas

IC: Intervalo de Confiança

NT: Não Tóxico

1: pH original dos efluentes sem qualquer ajuste

2: pH dos efluentes após diluição dos mesmos em água de cultivo com pH ajustado para 7,2, entre () o pH da maior e menor solução-teste das concentrações utilizadas no ensaio

A partir dos dados obtidos, pode-se observar que cada efluente produziu um resultado diferente.. Os efluentes da AA, AA+AV e nitração foram tóxicos tanto com pH ajustado como com o original, no entanto, os resultados indicam que o pH mais baixo parece ter favorecido o aumento da toxicidade. Para a AV e o efluente do branqueamento não houve grandes diferenças entre ajustar ou não o pH, pois em ambas as situações os efluentes foram tóxicos. Contudo, os efluentes da deslignificação e mistura não foram tóxicos com pH original na faixa de concentrações testadas, o que não significa que eles não sejam tóxicos. Todavia, há uma indicação, que para esses efluentes, o ajuste de pH formou alguma substância que os deixou mais tóxicos. O mais apropriado seria realizar um novo ensaio preliminar para identificar a faixa de toxicidade. No caso desses efluentes é realmente possível atribuir a toxicidade a algum composto formado na neutralização dos efluentes.

De acordo com informações pessoais obtidas na indústria de explosivos, que forneceu os efluentes, os mesmos tem seu pH ajustado para a faixa de 5 a 9 para posterior lançamento no corpo receptor. A Resolução CONAMA 357/2005, recomenda que o pH dos corpos aquáticos de classe 1, 2 e 3 esteja entre 6 a 9. Essa mesma resolução, em seu artigo 34, recomenda que os efluentes sejam lançados com pH entre 5 a 9. Portanto, o ajuste do pH visa atender à referida legislação.

Casso fosse mantido o pH original para a realização dos ensaios, esta situação não iria corresponder à realidade da indústria e da legislação em vigor — que preconiza valores de pH para lançamento em corpo receptor.

Segundo Cooney (1995), o pH de uma solução-teste pode afetar a toxicidade da substância-teste. Entretanto, ajustes no pH são usualmente realizados no início do teste e posteriormente apenas monitorados.

Liu et al. (1984), ao compararem a toxicidade de efluentes de uma indústria de munições e de uma solução contendo 90 mg/L de TNT sob diferentes condições de pH (5, 7, e 9), utilizando o peixe “fathead minnows” como organismo-teste, não encontraram diferença estatisticamente significativa entre os valores de CL50 96 h em diferentes condições de pH dos efluentes. Já para a solução de TNT o valor da CL50 aumentou com o aumento do pH. Em pH 5 a solução foi mais tóxica com diferença estatisticamente significante das demais. Entre os valores de pH 7 e 9 não houve diferença estatisticamente significante. Esse resultado sugere que o TNT pode ter sofrido mudança química enquanto estava em pH 5, que aumentou a sua toxicidade.

Segundo Liu et al. (1983) a temperatura da água, a dureza e o pH afetaram a toxicidade do TNT e, presumivelmente, das águas residuárias da indústria de munições por ele analisada, entretanto, a magnitude dos efeitos é relativamente pequena e provavelmente insignificante.

5.5.2 Coloração das amostras-teste

Algas

As algas necessitam de água, luz, gás carbônico e minerais para o crescimento e a manutenção da vida. Apesar da grande variação de cor, tamanho, forma e tipo de reprodução, todas as algas produzem seu próprio alimento através da fotossíntese, pois todas possuem

clorofila. A vida no ambiente aquático apresenta algumas dificuldades naturais como a penetração da luz, já que a partir de uma certa profundidade não há luz suficiente para a fotossíntese (VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004).

Além desse fator natural, pode ocorrer dificuldade de penetração luminosa e consequente diminuição da taxa de fotossíntese, devido ao lançamento de efluentes fortemente coloridos, como os que foram apresentados neste trabalho (AV, AA+AV) deslignificação e mistura. Segundo Vidotti e Rollemborg (2004), o balanço entre fotossíntese e respiração é responsável pelo controle da concentração de oxigênio na água e estes dois processos são importantes na purificação das águas naturais, distúrbios temporais ou localizados deste estado estacionário, levam a alterações biológicas e químicas que refletem poluição.

Conforme Reginatto (1998), a possibilidade de que amostras coloridas sejam avaliadas pelo ensaio de toxicidade com algas é muito pouco abordada na literatura, apesar dessa característica possa ser encontrada tanto em águas de ambientes naturais (pantanosas) quanto em efluentes industriais (papeleiro, têxtil e outros).

A coloração de alguns efluentes pode ser causada por moléculas orgânicas de alta massa molar (BANAT et al., 1996), como a lignina, por exemplo. Como as algas absorvem energia luminosa para a realização da fotossíntese, pode ocorrer que a luz fornecida às algas durante a realização dos experimentos seja parcialmente absorvida pelas substâncias coloridas componentes de águas superficiais e efluentes (REGINATTO, 1998).

Esse autor comenta ainda que, conforme os ensaios com algas são realizados normalmente, não é possível diferenciar se o efeito causado por amostras "coloridas" é um efeito tóxico real ou, simplesmente, se a luz fornecida às algas para o seu crescimento durante a realização do ensaio é, em parte, absorvida por essas amostras.

Esse mesmo autor avaliou esse tipo de interferência ao realizar ensaios de toxicidade crônica com a alga *Scenedesmus subspicatus* empregando amostras coloridas (efluente final da indústria de pectina, águas de pântanos, chorume, efluentes industriais com coloração escura e também soluções de substâncias húmicas comerciais). Os resultados obtidos neste trabalho revelaram que a distribuição espectral da luz influencia fortemente no crescimento da alga. Quando se deseja avaliar amostras "escuras", é necessário o fornecimento de intensidade de iluminação maior que 6000 Lux (dependendo da coloração da amostra), a fim de se alcançar o crescimento máximo das algas. Os parâmetros relacionados com luz sugeridos pela norma técnica da ABNT, para o ensaio com algas (5000 Lux \pm 10% sem mencionar o tipo de luz), podem acarretar em erros na determinação da toxicidade, principalmente quando amostras escuras são avaliadas.

Comber et al. (1995) realizaram um estudo propondo modificações na metodologia (OECD) de toxicidade com algas.. Para a utilização desta metodologia com amostras coloridas os autores propuseram o aumento da intensidade luminosa (8000-16000 lux), diminuição da densidade inicial do inóculo algal ($1,4 \times 10^4$ - $0,3 \times 10^4$) e redução do volume de solução-teste (100-30 mL). As substâncias de referência escolhidas para o teste foram o 3,5-diclorofenol e o dicromato de potássio. Os resultados obtidos confirmaram o efeito da redução da absorvância da luz. No entanto, se essas modificações propostas eliminaram completamente a interferência da absorção de luz pelas amostras-teste, ainda não foi confirmado.

Walsh et al. (1982) relatam que outros fatores poderiam afetar o crescimento das algas em biensaios com resíduos industriais: adsorção dos agentes tóxicos à parede dos recipientes-teste, degradação dos agentes tóxicos pela luz requerida para o crescimento algal e desenvolvimento de resistência aos agentes tóxicos pela população exposta. Para estes autores, por causa desse e de outros fatores que possivelmente pudessem afetar a resposta das algas aos agentes tóxicos, quatro dias de teste seriam suficientes.

A norma utilizada para a realização deste trabalho NBR 12648/05 recomenda iluminação contínua (lâmpada fluorescente) e com intensidade maior que 4500 lux. A mesma não diz qual a intensidade máxima da luz. Os efluentes da deslignificação, mistura, AV e AA+AV são fortemente coloridos e todos tiveram um valor de CEO igual a 0,20%. No entanto, devido ao fato de que todos esses efluentes possuem compostos altamente tóxicos, só um outro teste com repetição dos procedimentos adotados por Reginato (1998) ou Comber (1995) poderia confirmar se a elevada toxicidade neles encontrada poderia ser atribuída aos compostos presentes ou a redução da penetração da luz e conseqüente diminuição da fotossíntese.

5.6 Comparação da sensibilidade entre organismos

Utilizando-se o teste de Grubbs (BARROS NETO et al. 2007; BURATINI et al., 2004; BURATINI; BERTOLETTI, 2006; USEPA, 1985) - que leva em consideração os valores de CE50 e seus respectivos intervalos de confiança - foi determinado se havia diferença estatisticamente significativa entre os valores de CE50 e CL50 das espécies-teste utilizadas na avaliação da toxicidade aguda, dos efluentes da produção do TNT e nitrocelulose. Os resultados podem ser vistos na Tabela 31. A alga *P. subcaptata* não fez parte dessa

comparação porque no presente trabalho, não foi utilizado outro organismo para avaliar toxicidade crônica e assim estabelecer uma comparação de sensibilidade entre ambos.

Na produção do TNT houve diferença estatisticamente significativa entre todos os organismos para o efluente da AA. O peixe *D. rerio* (CE50=0,47%) seguido pelo microcrustáceo *D. similis* (CE50=0,65%) foram os organismos mais sensíveis para avaliação ecotoxicológica da AA. Para a AV não houve diferença significativa entre a CE50 de *D. similis* (CE50=0,30%) e *D. rerio* (CE50=0,35%), logo, ambos foram igualmente sensíveis.

Para a mistura da AA+AV o teste de Grubbs mostrou não haver diferença significativa entre os valores de CE50 de *D. similis* (CE50=0,52%) e *E. coli* (CE50=0,72), e *D. rerio* (CE50=0,74) e *E. coli* (CE50=0,72%). A bactéria *P. putida* foi o organismo menos sensível dos quatro que foram utilizados para avaliar a toxicidade dos efluentes do TNT. Mesmo assim, ela foi eficiente em indicar toxicidade aguda. *D. similis* foi o organismo mais sensível de todos.

Na comparação dos valores de CE50 dos efluentes da produção de nitrocelulose encontrou-se diferença significativa entre *D. similis* (CE50=0,23%) e *D. rerio* (CE50=2,29%), sendo *D. similis* mais sensível para detectar toxicidade aguda nos efluentes da deslignificação. O efluente do branqueamento mostrou dois grupos de organismos com comportamentos opostos: *D. similis* e *D. rerio* foram tão sensíveis a ponto de todos os indivíduos morrerem nas menores diluições testadas, 0,05 e 0,01% respectivamente. Enquanto isto, as bactérias *E. coli* (CE50=36,6%) e *P. putida* (CE50=73,11%) mostraram-se sobremaneira mais resistentes. Mesmo sendo menos sensíveis, as bactérias indicaram haver toxicidade no efluente.

O efluente da etapa da nitração da celulose foi o menos tóxico de todos, ele não inibiu o crescimento das bactérias *E. coli* e *P. putida* na concentração máxima permitida pelo teste (87,5%). Foram necessárias elevadas concentrações de efluente para determinar a concentração letal a 50% dos peixes (CL50=83,17%) e concentrações menores para imobilizar *D. similis* (CE50=22,69%). O teste de Grubbs indicou haver diferença significativa entre *D. similis* e *D. rerio*, sendo o primeiro organismo o mais sensível.

O efluente da mistura causou igual toxicidade para *D. similis* (CE50=2,64%) e *E. coli* (CE50= 2,4%) seguidos por *D. rerio* (CL50=4,42%). A bactéria *P. putida* não foi inibida por este efluente mesmo na sua maior concentração de 87,3%.

Tabela 31: Resultados dos testes de toxicidade aguda com respectiva análise estatística dos efluentes da produção de TNT e nitrocelulose.

Efluentes	Organismos comparados		Estatística (USEPA, 1985)		
			H	Z	Conclusão
AA	<i>E. coli</i> 1,98 (0,97-2,08) ^a	<i>D. similis</i> 0,65 (0,59-0,71)	1,10	3,05	C
AA	<i>P. putida</i> 1,74 (1,61-2,09)	<i>D. rerio</i> 0,47 (0,42-0,52)	1,23	3,70	C
AA	<i>E. coli</i> 1,98 (0,97-2,08)	<i>P. putida</i> 1,74 (1,61-2,09)	1,10	1,13	C*
AA	<i>D. similis</i> 0,65 (0,59-0,71)	<i>D. rerio</i> 0,47 (0,42-0,52)	1,12	1,38	C
AV	<i>D. rerio</i> 0,35 (0,27-0,45)	<i>D. similis</i> 0,30 (0,2-0,5)	1,70	1,56	B
AA+AV	<i>P. putida</i> 1,8 (1,78-2,32)	<i>E. coli</i> 0,72 (0,66-0,83)	1,35	2,5	C
AA+AV	<i>D. similis</i> 0,52 (0,42-0,65)	<i>D. rerio</i> 0,74 (0,71-0,78)	2,29	1,5	C
AA+AV	<i>D. similis</i> 0,52 (0,42-0,65)	<i>E. coli</i> 0,72 (0,66-0,83)	1,3	0,72	B
AA+AV	<i>D. similis</i> 0,52 (0,42-0,65)	<i>P. putida</i> 1,8 (1,78-2,32)	1,38	3,46	C
AA+AV	<i>D. rerio</i> 0,74 (0,71-0,78)	<i>E. coli</i> 0,72 (0,66-0,83)	2,24	2,05	B
AA+AV	<i>D. rerio</i> 0,74 (0,71-0,78)	<i>P. putida</i> 1,8 (1,78-2,32)	2,3	5,14	C
DES	<i>D. similis</i> 0,23 (0,20-0,28)	<i>D. rerio</i> 2,29 (2,15-2,43)	1,23	9,96	C
BRA	<i>E. coli</i> 36,6 (35,17-37,93)	<i>P. putida</i> 73,11 (71,11-74,25)	1,03	2,0	C
BRA	<i>D. similis</i> Imobilid. até 0,05%	<i>D. rerio</i> Imobilid. até 0,01%		Sensíveis	
NTR	<i>D. similis</i> 22,69 (20,02-25,72)	<i>D. rerio</i> 83,17 (78,92-87,65)	1,15	3,7	C
NTR	<i>P. putida</i>	<i>E. coli</i>		Resistentes	
MIS	<i>D. similis</i> 2,64 (2,34-3,01)	<i>D. rerio</i> 4,42 (4,14-4,70)	1,15	1,67	C
MIS	<i>D. similis</i> 2,64 (2,34-3,01)	<i>E. coli</i> 2,4 (1,50-3,36)	1,44	1,09	B
MIS	<i>D. rerio</i> 4,42 (4,14-4,70)	<i>E. coli</i> 2,4 (1,50-3,36)	1,41	1,84	C
MIS	<i>P. putida</i>	-		Resistente	

(a) Intervalo de confiança

(B) Diferença não significativa

(C) Diferença significativa

Z = CE50 maior ÷ CE50 menor; H = 10^G*E. coli* e *P. putida* CE50 6h; *D. rerio* CL50 48h; *D. similis* CE50 48h.

Legenda: DES (deslignificação), BRA (branqueamento), NTR (nitração) e MIS (mistura)

De acordo com as análises efetuadas a partir dos resultados apresentados na tabela 26, *D. similis*, *D. rerio* e *E. coli* foram os organismos-teste mais sensíveis para detectar toxicidade aguda nos efluentes da produção do TNT e nitrocelulose. A bactéria *E. coli* foi mais sensível somente em dois dos sete efluentes avaliados, AA+AV e mistura. Em algumas situações ela nem mesmo foi inibida.

Conforme reportado por Vaal et al. (1997b) algumas características biológicas poderiam contribuir para diferenças entre espécies como: dieta dos animais, que presumivelmente poderia causar uma diferenciação evolucionária no sistema de detoxificação de enzimas; diferenças entre grupos de organismos que são distintos na forma como utilizam recursos; no seu comportamento e habitat também diferenciam sua resposta aos impactos ambientais.

Segundo Farré e Barceló (2001), a principal vantagem dos ensaios de inibição de crescimento, é que eles avaliam todas as atividades celulares básicas, já que as mesmas são essenciais para que o microrganismo possa crescer e se multiplicar. A apropriada seleção dos organismos é outro fator essencial porque, algumas espécies de bactérias são especialmente sensíveis a um grupo de substâncias tóxicas, mas são altamente resistentes a outros.

Os dados apresentados na tabela 31 mostraram que a bactéria *P. putida* foi o organismo menos sensível em indicar toxicidade nos efluentes da nitração, mistura e branqueamento da nitrocelulose. Para os efluentes da produção do 2,4,6-TNT, este microrganismo foi capaz de indicar toxicidade, porém na comparação da sua sensibilidade com os demais testes ele foi menos sensível. A bactéria *E.coli* também falhou em indicar toxicidade no efluente da nitração, não foi o organismo mais sensível na comparação de sensibilidade, porém nos efluentes da AA+AV e mistura foi tão sensível quanto *D. similis*.

Vários autores têm levantado a hipótese de que as bactérias Gram-negativas são mais resistentes aos xenobióticos que as Gram-positivas, em particular ao 2,4,6-TNT (KURINENKO et al. 2005; KURINENKO et al. 2003; FULLER; MANNING, 1997). Contrariamente ao que foi exposto acima, os resultados obtidos na presente pesquisa mostraram que as bactérias *E.coli* e *P. putida* (Gram-negativas) foram eficientes em indicar toxicidade aguda nos efluentes da produção do TNT e falharam somente no efluente da nitração e mistura – *P. putida*. No caso do efluente da nitração a resistência poderia ser atribuída ao grande teor de nitrogênio presente neste efluente, que pode ter favorecido a sua utilização como nutriente para o crescimento destas bactérias. Já nos demais efluentes que inibiram o crescimento bacteriano, a resposta obtida poderia ser atribuída à sensibilidade das cepas utilizadas neste trabalho. Outros fatores relacionados à sensibilidade dos microrganismos estão relacionados à sua constituição e anatomia.

A diferença de sensibilidade entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas expostas aos compostos nitro aromáticos substituídos poderia ser atribuída à estrutura e composição da parede celular e à presença da membrana lipoprotéica externa, que protege os organismos Gram-negativos (FULLER; MANNING, 1997; KURINENKO 2005). De acordo com Kurinenko et al. (2005), a estabilidade e permeabilidade da membrana lipoprotéica externa variam significativamente de cepa para cepa.

Segundo Fuller e Manning (1997), a parede das células Gram-positivas seria mais permeável ao TNT, do que a parede celular e a membrana externa das Gram-negativas, permitindo então que o TNT entrasse e inativasse o funcionamento da célula. Além disso, pode ser que as bactérias mais resistentes, as Gram-negativas, sejam simplesmente menos permeáveis ao TNT do que os outros organismos, ou elas podem possuir também, um sistema de transporte que facilmente remova qualquer TNT que entre na célula para fora ou ainda, enzimas que detoxifiquem o TNT.

De acordo com Kurinenko et al. (2003), um fator tóxico pode induzir a adaptação metabólica para novas condições de vida por diferentes mecanismos, incluindo sistemas enzimáticos celulares para detoxificação de xenobióticos. Neste caso, o resultado depende: da resistência das enzimas aos efeitos inibitórios do xenobiótico (ou seus produtos metabólicos), e dos valores das constantes catalíticas das reações, nas quais onde os xenobióticos agem como substrato.

O peixe *D. rerio* e o microcrustáceo *D. similis* indicaram toxicidade aguda nos sete efluentes avaliados, mostrando-se bastante sensíveis. *D. rerio* mostrou ser mais sensível que *D. similis* para os efluentes do TNT. O contrário foi observado nos efluentes da nitrocelulose.

Martins et al. (2007) investigaram, a partir de um banco de dados, a sensibilidade de *D. magna* e *D. rerio* a uma ampla variedade de produtos e elementos químicos de diversas categorias químicas. Os resultados obtidos mostraram que ambos indicadores são igualmente sensíveis aos metais e pesticidas, mas menos sensíveis aos solventes. Os testes de toxicidade aguda 48 h com *D. magna* foram frequentemente mais sensíveis do que os testes com peixe, especialmente para metais, pesticidas, compostos nitrogenados e solventes.

Gellert (2000) relata os peixes não são muito sensíveis a compostos como AOX. Rodgers et al. (1996) utilizando a truta arco-íris e o microcrustáceo *D. magna* para avaliar efluentes industriais observaram ser o microcrustáceo o organismo mais sensível para a maioria dos efluentes. Sponza (2003) ao avaliar a toxicidade de efluentes da indústria de polpa e papel concluiu que os testes realizados com bactérias, algas e peixes foram os mais sensíveis. Riva e López (2001) avaliaram o impacto dos efluentes de branqueamento do algodão por de testes

ecotoxicológicos utilizando *D. rerio* (CL50=4,98%), *S. subspicatus* (CI=4,77%) e *P. phosforeum* (CE50=0,86%). Os resultados obtidos demonstraram que a bactéria foi o organismo mais sensível dos três.

Slabbert e Venter (1999) avaliaram a toxicidade de diversas amostras, dentre elas os efluentes de uma fábrica de papel, utilizando vários bioensaios: peixe, *Daphnia*, protozoário, alga e bactéria, os três primeiros organismos foram os mais eficientes. Esses autores elegeram os testes de letalidade com peixe e *Daphnia*, e inibição de crescimento com alga os mais indicados para fins de gerenciamento de impacto dos efluentes avaliados.

Burton et al. (1993) relataram que o TNT geralmente é mais tóxico a peixes do que a plantas aquáticas ou invertebrados. Liu et al. (1983) observaram que o peixe fathead minnows foi mais sensível que *D. magna* ao TNT e dos quatro peixes estudados, a truta arco-íris foi o mais sensível ao TNT.

Apesar do teste de toxicidade crônica realizado com a alga *P. subcaptata* não fazer parte da comparação de sensibilidade proposta para os demais organismos utilizados em testes de toxicidade aguda, há de se considerar que este organismo é fundamental na cadeia trófica por ser um produtor. Conforme os resultados apresentados nos itens 5.4.1.1 e 5.4.1.2 (Figuras 17 e 18) pode-se observar que os valores de CEO e CENO foram muito baixos para os efluentes, exceto o da nitrificação. Isto indica que os efluentes possuem toxicidade crônica e que a alga *P. subcaptata* mostrou-se muito sensível em evidenciar essa toxicidade.

Arenzon (2004), quando analisou a aplicabilidade de ensaios de toxicidade na avaliação da qualidade de águas subterrâneas potencialmente impactadas, também observou maior sensibilidade de *P. subcaptata* para as amostras analisadas em relação aos outros organismos testados: *P. promelas* e *C. dubia*. Segundo este autor a variação dos efeitos tóxicos pode estar relacionada com as diferenças nas sensibilidades dos organismos à complexidade dos compostos presentes nas amostras, à biodisponibilidade de certas substâncias ou pode ser decorrente da presença de compostos que não foram analisados.

Geis et al. (2000) reportaram que as algas apresentaram-se mais sensíveis que invertebrados e peixes, em 50% dos casos, mas podem ser menos sensíveis em 30%. Rodrigues (2002) concluiu que a alga *P. subcaptata* pode ser considerada um bom organismo-teste para indicar impactos ambientais, podendo ser inclusive mais sensível que outros organismos da biota aquática, quando expostos a um mesmo agente. Hartman (2004) ao avaliar a toxicidade de efluentes de origem petroquímica concluiu que *P. subcaptata* também foi o organismo mais sensível às amostras avaliadas.

De fato não existem resultados de outros testes de toxicidade crônica com os quais se possam comparar aqueles obtidos para *P. subcaptata*. No entanto, o que se quer mostrar é que se os efluentes da produção do TNT e nitrocelulose forem lançados em um corpo receptor, provavelmente, haverá um grande dano sobre a comunidade algal, especialmente sobre a espécie em questão, diminuindo a quantidade de alimento para os consumidores primários e assim, sucessivamente, na cadeia trófica. Por fim, haveria um desequilíbrio em todos os níveis já que os mesmos efluentes mostraram-se tóxicos aos daphnídeos e aos peixes também. Um problema que poderia surgir disto tudo é a proliferação de bactérias resistentes a esses poluentes como *P. putida*, devido à grande quantidade de matéria orgânica que estaria em decomposição, além da redução do oxigênio dissolvido na água.

As algas são o principal alimento dos invertebrados aquáticos. Um agente tóxico pode agir sobre o zooplâncton e permitir assim o aumento exagerado das algas, ou agir sobre as algas e faltar alimento para o zooplâncton, causando uma ação seletiva de um composto em relação à sensibilidade das espécies atingidas.

Conforme Walsh et al. (1982), os organismos consumidores em geral são mais sensíveis do que as algas a poluentes como pesticidas e metais pesados, mas há evidências de que as algas são mais sensíveis do que os consumidores quando se trata de efluentes complexos, como os industriais e municipais.

Os resultados aqui obtidos e em outros trabalhos (SLABBERT; VENTER, 1999; SPONZA, 2003; RIVA; LÓPEZ, 2001; ROJÍKOVA-PADRTOVÁ, 1998) que avaliaram a sensibilidade das espécies-teste, demonstraram que todos os organismos avaliados possuem um papel fundamental no monitoramento e controle de impactos aos ambientes aquáticos. Esses estudos evidenciaram também que não há um método-teste único que possa garantir, de modo satisfatório, a proteção dos ambientes aquáticos. Além do mais, um teste de toxicidade realizado em laboratório não pode prever as alterações que irão ocorrer na competição, predação, funcionamento da comunidade, transferência de energia e ciclagem de nutrientes após a morte de uma espécie. Problemas durante a realização dos testes também podem ocorrer como a neutralização de determinadas substâncias tóxicas presentes na amostra em teste (CETESB, 1987).

Alguns dos fatores levantados por Vaal. et al. (1997b) para explicar a variação da sensibilidade dos organismos em ensaios ecotoxicológicos, poderiam ajudar na compreensão dos resultados encontrados. O modo de ação dos agentes tóxicos pode causar diferenças na sensibilidade dos organismos,

No presente trabalho, se apenas os testes bacterianos fossem utilizados para avaliar os efluentes da nitrção e mistura, os mesmos não seriam considerados tóxicos e poderiam ser lançados no ambiente causando grandes danos. Por isso, se somente uma espécie-teste é utilizada a toxicidade estimada poder refletir a sensibilidade desse teste apenas, com risco de subestimar o potencial tóxico para aquela substância, em particular, com relação ao ecossistema. Entretanto, a utilização de uma bateria de bioensaios, com organismos-teste de vários níveis tróficos reduz esse risco, garantindo a sua proteção e das demais espécies que fazem parte daquele ecossistema.

Portanto, não existe um bioensaio universal que possa detectar todos os agentes tóxicos, igualmente bem. Por consequência, deve-se utilizar os bioensaios de toxicidade na forma de baterias de testes, uma vez que as vantagens de alguns testes podem complementar a limitação de outros. Uma bateria de testes pode incluir testes com organismos de vários níveis do ecossistema.

De acordo com os resultados de comparação de sensibilidade apresentados acima, os organismos escolhidos para formar uma bateria de testes “ideais” para os efluentes da produção do TNT e da nitrocelulose seriam: *D. similis*, *D. rerio* e a alga *P. subcaptata*.

6. CONCLUSÕES

Considerando-se os objetivos definidos para este trabalho, após os estudos realizados conlui-se que:

- os parâmetros físico-químicos analisados mostraram elevados valores de condutividade, DQO e sólidos totais dissolvidos. Os mesmos podem ser considerados como um fator de toxicidade dos efluentes. O pH original dos efluentes ficou fora do que é preconizado no artigo 34 da Resolução CONAMA 357/2005, pH de 5 a 9 para o lançamento de efluentes. A cor dos efluentes, água vermelha e deslignificação causou interferência na realização dos ensaios bacterianos. Logo, é necessário, o tratamento dos efluentes para lançamento em um corpo receptor.
- por meio dos ensaios de toxicidade realizados verificou-se que todos os efluentes avaliados, tanto os da produção do 2,4,6-TNT como da nitrocelulose, possuem toxicidade aguda e crônica.
- de acordo com a análise estatística realizada, *D. similis* e *D. rerio* foram os organismos-teste mais sensíveis para todos os efluentes da produção do 2,4,6-TNT e nitrocelulose, seguidos pela bactéria *E.coli* que foi tão sensível quanto eles apenas em três efluentes. Apesar de indicar toxicidade na maioria dos efluentes, a bactéria *P. putida* foi menos sensível em relação aos demais organismos utilizados.
- com os resultados obtidos nesse trabalho, pode-se recomendar os seguintes organismos para formar uma bateria de testes na avaliação da toxicidade dos efluentes da produção do 2,4,6-TNT e da nitrocelulose: *D. similis*, *D. rerio* e *E.coli* para toxicidade aguda. *E. coli* não seria indicada para o efluente da nitração.
- com relação aos efluentes, o do branqueamento foi o mais tóxico e o da nitração da nitrocelulose o menos tóxico.

7. RECOMENDAÇÕES

Para dar continuidade a esse trabalho propõe-se:

- monitoramento a montante e a jusante do ponto de lançamento dos efluentes no corpo receptor, com as espécies já estudadas e com outras nativas do próprio ambiente.
- avaliação da toxicidade dos efluentes estudados após sistema de tratamento.
- a realização de ensaios de toxicidade crônica nos efluentes da produção do TNT e nitrocelulose com *C. dubia* e *P. subcaptata* para comparação dos resultados obtidos e seleção da espécie mais sensível.
- utilização de duas espécies de bactérias Gram-positivas para comparação de sensibilidade entre elas e entre as Gram-negativas já utilizadas.
- realização de estudos de avaliação e identificação de toxicidade (AIT) nos efluentes analisados.

REFERÊNCIAS

ADAMS, W. J.; ROWLAND, C. D. Aquatic Toxicology Test Methods . In: autores. **Quantifying and Measuring Ecotoxicological Effects**. 2nd. Boca Raton, Florida: CRC Press. 2003. Cap. 2.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry Toxicological profile for 2,4,6-trinitrotoluene. Washington, DC: Public Health Service: U. S. Department of Health and Human Services, 1995. 208 p.

AHTIAINEN, J. VALO, R., JARVINEN, M.; JOUTTI, A. Microbial toxicity tests and chemical analysis as monitoring parameters at composting of creosoto-contaminated soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 53, p. 323-329, 2002.

ALI, M.; SREEKRISHANAN, T. R. Aquatic toxicity from pulp and paper mill effluents: a review. **Advances in Environmental Research**, v. 5, p. 175-196, 2001.

ALSOP, G.M; WAGGY, G.T.; CONWAY, R.A. Bacterial growth inhibition test. **Journal WPCF**, v. 52, n 10, p. 2452-2456, 1980.

APHA - AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION WATER POLLUTION CONTROL FEDERATION. **Standard Methods for The Examination of Water and Wastewater Analysis**. 20 ed. Washington: American Public Health Association, 1999.

ARAGÃO, M. A.; ARAÚJO, R. P. A. Métodos de ensaios de toxicidade com organismos aquáticos. In: ZAGATTO, P. A. e BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática Princípios e Aplicações**. São Carlos: Rima Editora, 2006. p. 117-152.

ARENZON, A. **Ensaios ecotoxicológicos no monitoramento da qualidade de águas subterrâneas potencialmente impactadas**. 2004. 112 f. Tese (Doutorado em Ecologia) – Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2004.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 15088**: Ecotoxicologia aquática – toxicidade aguda – método de ensaio com peixes. Rio de Janeiro. 2006.

_____. **NBR 13373**: ecotoxicologia aquática – toxicidade aguda – método de ensaio com *Ceriodaphnia* spp (Cladocera, Crustacea). Rio de Janeiro. 2006.

_____. **NBR 12648**: ecotoxicologia aquática – toxicidade aguda – método de ensaio com algas (*Chlorophyceae*). Rio de Janeiro. 2005.

_____. **NBR 12713**: ecotoxicologia aquática – toxicidade aguda – método de ensaio com *Daphnia* spp (Cladocera, Crustacea). Rio de Janeiro. 2004.

BAEZ, M. C. D.; ROSSINI, G. D. B.; GRANADOS, Y. P. Métodos estadísticos para el análisis de resultados de toxicidad. In: CASTILLO, G. **Ensayos toxicológicos y metodos de evaluación de calidad de aguas**. Editora: IDRC/IMTA, 2004. cap. 5. p. 202.

BAJPAI, P. Microbial degradation of pollutants in pulp mill effluents. **Advances in Applied Microbiology**, v. 48, p. 79-134. 2001.

BANAT, L. M.; NIGAM, P.; SINGH, D. Microbial decolorization of textile-dye-containing effluents: a review. **Bioresource Technology**, v. 58, p. 217-227, 1996.

BARKLEY JUNIOR, J. J.; ROSEMBLATT, D. H. **Automated nitrocellulose analysis. Technical Repor**. Fort Detrick: U. S. Army Medical Bioengineering Research and Development Laboratory, 1978. 35 p. (ADA 067081).

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos**. Campinas: Editora Unicamp, 2007. p. 25-98.

BENTLEY, R. E.; LEBLANC, G. A.; HOLLISTER, T. A.; SLEIGHT, B. H. **Laboratory evaluation of the toxicity of nitrocellulose to aquatic organisms**: Final Report. Wareham, Massachusetts: US Army Medical Bioengineering Research and Development Laboratory, 1977. 34 p. (ADA 037749).

BITTON, G.; DUTKA, J.B. Introduction and review of microbial and biochemical toxicity screening procedures. In: _____. **Toxicity Testing using Microorganisms**. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1986a. v.1, p 1-8.

BITTON, G.; DUTKA, J.B. Introduction and review of microbial and biochemical toxicity screening procedures. In: _____. **Toxicity Testing using Microorganisms**. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1986b. v.2, p 1-8.

BLAISE, C. Canadian application of bioassays for environmental management: a review. *Sediment Quality Assessment and Management: Insight and Progress*. **Sediment Quality Assessment and Management**, p. 39-57, 2003.

BLAISE, C. WELLS, P. G.; LEE, K. Microscale testing in aquatic toxicology: introduction, historical perspective, and context. In: _____. **Microscale Testing in Aquatic Toxicology advances, techniques, and practice**. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1998, p. 1-9.

_____. Microbiotesting: an expanding field in aquatic toxicology. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 40, p. 115-119, 1996.

BLAISE, C.; LEGAULT, R.; BIRMINGHAM, N.; VAN COILLIE, R.; VASSEUR, P. A simple microplate algal assay technique for aquatic toxicity assessment. **Toxicity Assessment**, v.1, p. 261-281, 1986.

BLUM, D. J. W.; SPEECE, R. E. Determining chemical toxicity to aquatic species. **Environmental Science and Technology**, v.24, n.3, p. 284-293, 1990.

BOUYD, E. M.; KILLHAM, K.; MEHARG, A. A. Toxicity of mono-, di- and tri-chlorophenols to lux marked terrestrial bacteria, Burkholderia species Rase c2 and *Pseudomonas fluorescens*. **Chemosphere**, v. 43, p. 157-166, 2001.

BRASIL. Conselho Nacional de Meio Ambiente. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Resolução nº 357, 17 de março de 2005. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, n. 53, p. 58, março de 2005.

BRINGMANN, G.; KUEHN, R. Limiting values for the damaging action of water pollutants to bacteria (*Pseudomonas putida*) and green algae (*Scenedesmus quadricauda*) in the cell multiplication inhibition test. **Z. Wasser Abwasser Forsch**, v.10, p. 87-98, 1977. apud

BUIKEMA JR, A. L., NIEDERLEHNER, B.R.; CAIRNS JR, J. Biological Monitoring Part IV – Toxicity Testing. **Water Research**, v. 16, p. 239-262, 1982.

BURATINI, M. S. V.; BERTOLETTI, E. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática Princípios e Aplicações**. São Carlos: Rima Editora, 2006. p. 221-249, 2004.

BURATINI, M. S. V. **Efeitos do meio de cultivo sobre a sobrevivência, reprodução e sensibilidade de *Ceriodaphnia dubia***. 2002. f., 2002. Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia Ambiental) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2002.

BURLINSON, N. E. **Fate of TNT in aquatic environment: photodecomposition vs. biotransformation**. White Oak, Silver Spring: Naval Surface Weapons Center, 1980. (AD B045846)

BURROWS, E. P.; ROSEMBLATT, D. H.; MITCHELL, W. R.; PARMER, D. L. **Organic explosives and related compounds: environmental and health considerations**. Fort Detrick, MD: U. S. Army Biomedical Research and Development Laboratory, 1989. (AD-A210 554)

BURTON, D. T.; TURLEY, S. D.; PETERS, T. G. **Toxicity of nitroguanidine, nitroglycerin, hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX), and 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) to selected freshwater aquatic organisms**. Fort Frederick, Frederick: U. S. Army Medical Research and Development Command, 1993. 154 p. (AD-A267 467)

CAIRNS JUNIOR., J.; MOUNT, D. Aquatic toxicology. **Environmental Science and Technology**, v.24, n.2, p. 154-161, 1990.

CAIRNS JUNIOR., J. The role of ecotoxicology in industrial ecology and natural capitalism. In: HOFFMAN, J. D.; RATTNER, B. A.; BURTON Jr., G. A.; CAIRNS Jr., J. **Handbook of Ecotoxicology**. Boca Raton: CRC Press, 2004. p. cap. 42.

Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. **Procedimentos para utilização de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos**. São Paulo, 1992. 17 p.

_____. **Métodos de Avaliação da Toxicidade de Poluentes a Organismos Aquáticos**. São Paulo. 1991.

_____. **Avaliação e gerenciamento de substâncias tóxicas em águas superficiais. Estudo de caso Rio Paraíba do Sul**. São Paulo. 1990. 92 p.

_____. **Aplicação de microrganismos e culturas celulares na avaliação da toxicidade de efluentes industriais na região da Grande São Paulo: Relatório Final**. São Paulo, 1987a. 147 p.

_____. **Avaliação da toxicidade de efluentes líquidos de algumas indústrias localizadas na bacia do Rio Piracicaba.** São Paulo, 1987b. 8 p.

_____. **Avaliação da toxicidade de efluentes de indústrias de papel e celulose.** São Paulo, 1986a. p. 56.

_____. **Teste de toxicidade com *Chlorella vulgaris*.** L5.020. São Paulo, 1986b.

_____. **Padronização de bioensaios.** Programa ISO. Relatório Final. São Paulo, 1978. 109 p.

CABALLERO, A.; RAMOS, J. L. A double mutant of *Pseudomonas putida* JLR11 deficient in the synthesis of the nitroreductase PnrA and assimilatory nitrite reductase NasB is impaired for growth on 2,4,6-trinitrotoluene (TNT). **Environment Microbiology**, v. 8, p. 1306-1310, 2006.

CENCI, G.; CALDINI, G.; MOROZZI, G. Chlorinated phenol toxicity by bacterial and biochemical tests. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 38, p. 868-875, 1987.

CHANG, J. I.; CHEN, C.H. and LIU, G.S.Y. The experience of waste minimization at a nitrocellulose manufacturing plant. **Resources Conservation and Recycling**, v.30, p. 333-351, 2000.

CHEN, C-Y. e LIN, J-H. Toxicity of chlorophenols to *Pseudokirchneriella subcaptata* under air-tight test environment. **Chemosphere**, v. 62, p. 503-509, 2006.

CHEN, C-Y.; LU, C-L. An analysis of the combined effects of organic toxicants. **The Science of the Total Environment**, v. 289, p. 123-132, 2002.

CHEN, C. M.; SHIH, M. L.; LEE, S. Z. e WANG, J. S. Increased toxicity of textile effluents by a chlorination process using sodium hypochlorite. **Water Science and Technology**. v. 43, n. 2, p. 1-8, 2001.

CHEREPNEV; G. V.; VELIZHINSKAYA, T. A.; YAKOVLEVA, G. YU, DENIVAROVA, N. A.; KURINENKO, B. M. Assessing the toxic effect of 2,4,6-trinitrotoluene on cells of *Escherichia coli* K12 by flow cytofluorometry. **Microbiology**, v. 76, n. 3, p. 331-335, 2007.

CLAXTON, D. L.; HOUK, S. V.; HUGHES, T. J.; Genotoxicity of industrial wastes and effluents. **Mutation Research**, v. 410, p. 237-243, 1998.

COELHO, M. C. L. S. **Mutagenicidade de quatro efluentes líquidos industriais lançados no rio Paraíba do Sul, avaliada através do teste de Ames.** 1995. 81 f. Dissertação (Mestrado em Biologia) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo. 1995.

COMBER, M. H.; SMYTH D. V.; THOMPSON, R. S. **Bulletin Environmental Contamination Toxicology.** v. 55, p. 922-928, 1995.

COOPER, D. C.; EISCHEN, M. A.; HOLZWORTH, D. A.; JAKOBSEN, R. J.; SHERWOOD, B. E.; STILWELL, J. M. e STRUP, P. E. **Aquatic field surveys at Badger, Joliet, and Lake City Army Ammunition Plants: Final Phase I Report.** Columbus: Battelle Columbus Laboratories, 1975. 169 p. (DAMD17-74-C-4123).

COONEY, J. D. Freshwater tests. In: RAND, G. M. **Fundamentals of Aquatic Toxicology. Effects, environmental fate and risk assessment.** 2^{ed}. Whashington D.C.: Taylor & Francis. 1995. cap. 2, p. 71-102.

CPPA. **Technical Section Standard Method H5P,** 1975.

CULP, J. M.; LOWELL, R. B. Pulp mill effluent impacts on benthic communities and selected fish species in the fraser river basin. In: GRAY, C.; TUOMINEN, T. **Health of the fraser river aquatic ecosystem: a synthesis of research conducted under the Fraser River Action Plan.** Vancouver: Aquatic and Atmospheric Sciences Division Environment Canadá, 1999. p. 13-34. v. 2.

DAVE, G.; NILSSON, E.; WERNERSSON, A.-S. Sediment and water phase toxicity and UV-activation of six chemicals used in military explosives. **Aquatic Ecosystem Helath and Management,** v. 3, p. 291-299, 2000.

DAUN, G.; LENKE, H.; REUSS, M.; KNACKMUSS, H-J. Biological treatment of TNT-contaminated soil. **Environmental Science and Technology,** v. 32, p. 1956-1963.

DAVEMPORT, R.; JOHNSON, L. R.; SCHAEFFER, D. J e BALBACH, H. Light-enhanced toxicity of TNT ans some related compounds to Daphnia magna and Lytechinus variagatus embryos. **Ecotoxicology and Environmental Safety,** v. 27, p. 14-22, 1994.

DODARD, S.G.; RENOUX, A. Y.; HAWARI, J.; AMPLEMAN, G.; THIBOUTOT, S.; SUNAHARA, G. I. Ecotoxicity characterization of dinitrotoluenes E some of their reduced metabolites. **Chemosphere,** v. 38, n.9, p. 2071-2079, 1999.

DRZYZGA, O. Diphenilamine and derivatives in the environmental: a review. **Chemosphere**, v. 53, p. 809-818, 2003.

DUQUE, E.; HAÏDOUR, A.; GODOY, F.; RAMOS, L. Construction of a *Pseudomonas* hybrid strain that mineralizes 2,4,6-trinitrotoluene. **Journal of Bacteriology**, v. 175, p. 2278-2283, 1993.

ENVIRONMENT CANADA, HEALTH CANADA. **Effluents from pulp mills using bleaching – PSL1**. cap. 4. 1991. Disponível em <<http://www.hc.sc.gc.ca>>

ENZINGER, R. M. **Special study of the effect of alpha-TNT on microbiological systems and the determination of the biodegradability of alpha-TNT**. Edgewood: Environmental Hygiene Agency, 1971. (AD 728497)

ESTEVE-NÚÑEZ, A.; CABALLERO, A.; RAMOS, J. L. Biological degradation of 2,4,6-Trinitrotoluene. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, n. 3, 2001.

FARRÉ, M.; BARCELÓ, D. Toxicity testing of wastewater and sewage sludge by biosensors, bioassays and chemical analysis. **Analytical Chemistry**, v. 22, n 5, p. 299-310, 2003.

_____. Characterization of wastewater toxicity by means of a whole-cell bacterial biosensor, using *Pseudomonas putida*, in conjunction with chemical analysis. **Fresenius Journal Analytical Chemistry**, v. 371, p. 467-473, 2001.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood Chemistry Ultrastructure and Reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 1984. 613 p.

FRACASSO, M. E.; LEONE, R.; BRUNELLO, F.; MONASTRA, C.; TEZZA, F.; STORTI, P. V. Mutagenic activity in wastewater concentrates from dye plants. **Mutation Research**, v. 298, p. 91-95, 1992.

FRANK, D. M. **Cellulose Nitrate: The physical chemistry of nitrocellulose its formation and use**. Published for Imperial Chemical Industries Limited., 422 p, 1955 apud SANTOS, F.T. **Sistemas de lodos ativados aplicados no tratamento de efluentes oriundos das etapas de fabricação de nitrocelulose**. 2001. 103f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Departamento de Biotecnologia, Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena, 2001.

FREIRE, C. S. R.; SILVESTRE, A. J. D.; NETO, C. P. Carbohydrate derived chlorinated compounds in ECF bleaching of hardwood pulps: formation, degradation and contribution to

AOX in a bleached kraft pulp mill. **Environmental Science Technology**, v. 37, p. 811-814. 2003.

FREIRE, R. S.; KUNZ, A.; DURÁN, N. Some chemical toxicological aspects about paper mill effluent treatment with ozone. **Environmental Technology**. v. 21, p.717-721, 2000.

FU, P. P. Metabolism of Nitro-polycyclic aromatic hydrocarbons. **Drug Metabolism Reviews**, v. 22, p.209-268, 1990.

FULLER, M. E.; MANNING Jr., J. F. Aerobic Gram-positive and Gram-negative bacteria exhibit differential sensitivity to and transformation of 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT). **Current Microbiology**, v. 35, p. 77-83, 1997.

GADD, G. M. Toxicity screening using fungi e yeasts. In BITTON, G. and DUTKA, J.B. **Toxicity Testing using Microorganisms**. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1986. C.3, 43-77.

GEIS, S. W.; FLEMING, K.; KORTHALS, E.; SEARLE, G.; REYNOLDS, L.; KARNER, D. Modifications to the algal growth inhibition test for use as a regulatory assay. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 19, n. 1, p. 36-41, 2000.

GELLERT, G. Relationship between summarizing chemical parameters like AOX, TOC, TN_b, and toxicity tests for effluents from the chemical production. **Bulletin Environmental Contamination Toxicology**, v. 65, p. 508-513, 2000.

GHERARDI-GOLDSTEIN, E.; BERTOLETTI, E.; ZAGATTO, P. A. ARAÚJO, R. P. A.; RAMOS, M. L. L. C. Procedimentos para utilização de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos. São Paulo: CETESB/PROCOP, 1990.

GONZÁLEZ-PÉREZ, M. MAR.; VAN DILLEWIJN, P. Escherichia coli has multiple enzymes that attack TNT and release nitrogen for growth, **Environmental Microbiology**, v. 9, n. 6, p. 1535-1540, 2007.

GRAHAM, L. E.; WILCOX, L. W. **Algae**. Prentice-Hall. Upper Saddle River: 2000. p 500.

GUERRA, R. Ecotoxicological and chemical evaluation of phenolic compounds in industrial effluents. **Chemosphere**, v. 44, p. 1737-1747, 2001.

GULLEY, D. **Toxstat Program**. University of Wyoming. Western EcoSystems Technology, Inc. Version 3.4. 1994.

HAMILTON, M.A.; RUSSO, R.; THURSTON, R. V. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environmental Science and Technology**, v.11, p. 714-718, 1977.

HANSEN, G. L.; SHANE, S. B. Xenobiotic Metabolism. In: COOKERHAM, G. H.; SHANE, S. B. **Basic Environmental Toxicology**. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1994. cap. 3, p. 49-73.

HAO, J. O.; PHULL, K. K.; CHEN, J. M. Wet Oxidation of TNT Red Water and Bacterial Toxicity of Treated Waste. **Water Research**, v. 28, n. 2, p. 283-290, 1993.

HARTMAN, C. C. **Avaliação de um efluente industrial através de ensaios ecotoxicológicos e análises físicas e químicas**. 2004. 85 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) – Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

HAWARI, J.; HALASZ, A.; PAQUET, L.; ZHOU, E.; SPECER, B.; AMPLEAMAN, G.; THIBOUTOT, S. Characterization of metabolites in the biotransformation of 2,4,6-Trinitrotoluene with anaerobic sludge: role of triaminotoluene. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 6, p. 2200-2206. 1998.

HONEYCUTT, E. M.; JARVIS, A. S.; MCFARLAND, V. A. Cytotoxicity and mutagenicity of 2,4,6-trinitrotoluene and its metabolites. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 35, p. 282-287, 1996.

IERO, A.; MANENTE, S.; PERIN, G.; BRAGADIN, E. Frozen mitochondria as rapid water quality bioassay. **Chemosphere**, v. 52, p. 1115-1123, 2003.

JAGER, T.; POSTHUMA, L.; ZWART, D.; VAN DE MEENT, D. Novel view on predicting acute toxicity: decomposing toxicity data in species vulnerability and chemical potency. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 67, p. 311-322, 2007.

JARDIM, W. F.; PASQUINI, C.; GUIMARÃES, J. R. Short-term toxicity test using *Escherichia coli*: Monitoring CO₂ production by flow injection analysis. **Water Research**, v.24, p.351-354, 1990.

JOHNSON, L. R.; DAVEMPORT, R.; BALBACH, H.; SCHAEFFER, D. J. Comparative toxicity of trinitrotoluene and aminodinitrotoluenes to *Daphnia magna*, *Dugesia dorocephala* e Sheep erythrocytes. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 27, p. 34-49, 1994.

KAMAYA, Y.; TOKITA, N.; SUZUKI, K. Effects of dehydroabiatic acid and abietic acid on survival, reproduction, and growth of the crustacean *Daphnia magna*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 61, p. 83-88, 2005.

KAPLAN, D. L.; KAPLAN, A. M. Thermophilic biotransformations of 2,4,6-trinitrotoluene under simulated composting conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 44, p. 757-760, 1982.

KEFFORD, B. J.; ZALIZNIAK, L. WARNE, M. St. J.; NUGEGODA, D. In the integration of hormesis and essentiality into ecotoxicology now opening Pandora's Box? **Environmental Pollution**, v. xx, p. 1-8, 2007. (in press).

KEITH, L. H.; TELLIARD, W. A. Priority Pollutants I – a perspective view. **Environmental Science and Technology**, v.13, n. 4, p. 416-423, 1979.

KENEGA, E. Test organisms E methods useful for early assessment of acute toxicity of chemicals. **Environmental Science and Technology**, v. 12, n 12, p. 1322-1329, 1978.

KIM, B. J.; HSIEH H-N.; TAI, F-J. **Anaerobic digestion and acid hydrolysis of nitrocellulose. US army Corps of engineers.** Construction Engineering Research Laboratories. CERL Technical Report 94/45. 1999, p. 11-17.

KOIVISTO, S. Is *Daphnia magna* an ecologically representative zooplankton species in toxicity tests? **Environmental Pollution**, v. 90, n. 2, p. 263-267, 1995.

KOTELEVTSSEV, S. V.; HÄNNINEN, O. O. P.; LINDSTRÖM-SEPPÄ, P. A.; HUUSKONEN, S. E.; STEPANOVA, L. I.; GLASER, V. M. e BEIM, A. M. Mutagenicity of bleached and unbleached effluents from Baikalsk pulp and paper mill at Lake Baikal, Russia. **Aquatic Ecosystem Health and Management**. v. 3, p. 95-104, 2000.

KRAMER, K.J.M.; BOTTERWEG, J. **Aquatic biological early warning systems: an overview. Bioindicators and Environmental Management.** Academic Press Limited., 1991. p. 95- 126.

KURINENKO, B. M.; DENIVAROVA, N. A.; DAVYDOV, R. E.; YAKOVLEVA, G. YU. Features of the toxic action of 2,4,6-trinitrotoluene on *Escherichia coli* K12. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 52-56, 2007.

KURINENKO, B. M.; DENIVAROVA, N. A.; YAKOVLEVA, G. YU. Sensitivity of various *Escherichia coli* strains to 2,4,6-trinitrotoluene. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 47-50, 2005.

KURINENKO, B. M.; YAKOVLEVA, G. YU.; DENIVAROVA, N. A.; ABREIMOVA, YU. V. Specific toxic effects of 2,4,6-Trinitrotoluene on *Bacillus subtilis* SK1. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 275-278, 2003.

LAH, B.; GORJANC, F. V.; NEKREP, F. V.; MARINSEK-LOGAR, R. Comet assay assessment of wastewater genotoxicity using yeast cells. **Bulletin Environmental Contamination Toxicology**, v. 72, p. 607-616, 2004.

LARINI, L. **Toxicologia**. 2nd ed. São Paulo: Editora Manole, 1993. 281p.

LATORRE, A.; RIGOL, A.; LACORTE, S.; BARCELÓ, D. Organic Compounds in paper mill wastewaters. *The Handbook of Environmental Chemistry*, v. 5, Part O, p. 25-51, 2005.

LEE, Y. G.; HWANG, S. H.; KIM, S. D. Predicting the toxicity of substituted phenols to aquatic and its changes in the stream and effluent waters. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 30, p. 213-219, 2006.

LEE, H-B.; PEART, T. E.; CARRON, J. M. Gas chromatographic and mass spectrometric determination of some resin and fatty acids in pulpmill effluents as their pentafluorobenzyl ester derivatives. **Journal of Chromatography**, v. 498, p. 367-379, 1990.

LEWIN, M; GOLDSTEIN, I. S. **Wood Structure and Composition**. New York: Marcel Dekker, 1991. 512 p.

LILIUS, H.; SEBACKA, M.; ISOMAA, B. The use of freshly isolated gill epithelial cells in toxicity testing. *Toxic. In vitro*. v. 9. n 3. 1995. p. 299-305. MALONEY, S. W.; ADRIAN, N. R.; HICKEY, R. F. E HEINE; R. L. Anaerobic treatment of pinkwater in a fluidized bed reactor containing GAC. **Journal of Hazardous Materials**, v. 2792, p. 1-12, 2002.

LINDSTRÖM-SEPPÄ, P.; HUUSKONEN, S.; KOTELEVTSSEV, S.; MIKKELSON, P.; RÄÄNEN, T.; STEPANOVA, L.; HÄNNINEN. Toxicity and mutagenicity of waste waters from Baikalsk pulp and paper mill: evaluation of pollutant contamination in Lake Baikal. *Marine Environmental Research*, v. 46, n 1-5, p. 273-277, 1998.

LISS, S. N.; BICHO, P. A.; SADDLER, J. N. Microbiology and biodegradation of resin acids in pulp mill effluents: a minireview. **Canadian Journal Microbiology**, v. 75, p. 599-611, 1997.

LIU, D. H. W.; SPANGGORD, R. J.; BAILEY, H. C.; JAVITZ, H. S.; JONES, D. C. L. **Toxicity of TNT wastewaters to aquatic organisms. Final Report: acute toxicity of LAP wastewater and 2,4,6-trinitrotoluene.** Fort Frederick, Frederick: U. S. Army Medical Bioengineering Research and Development Laboratory, 1983. 82 p. (AD- A142 144)

LUH, M. D.; SZACHTA, J. M. **Evaluation of industrial liquid waste treatment facilities/processes at Radford Ammunition Plant.** Technical Report. Aberdeen Proving Ground, MD, 1978. 51 p.

MAGALHAES, D. P.; CUNHA, R. A.; SANTOS, J. A. A.; BUSS, D. F.; BAPTISTA, D. F. Behavioral response of Zebrafish *Danio rerio* Hamilton 1822 to sublethal stress by sodium hypochlorite: ecotoxicological assay using an image analysis biomonitoring system. **Ecotoxicology**, v. 16, p. 417-422, 2007.

MANAHAN, S. E. Toxicological chemistry of chemical substances. In: MANAHAN, S. E. **Fundamentals of environmental chemistry.** 2ed. Boca Raton: CRC Press, 2000. p. 807-839.

MARTINS, J.; TELES, L. O.; VASCONCELOS, V. Assays with *Daphnia magna* and *Danio rerio* as alert systems in aquatic toxicology. **Environment International**, v. 33, p. 414-425, 2007.

MASUTTI, M. B. **Distribuição e efeitos de cromo e cobre em ecossistemas aquáticos: uma análise laboratorial e "In situ" (experimentos em micro e mesocosmos).** 2004. 371 f. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2004.

MATTICE, J. S.; BURCH, M. B; TSAI, S. C AND ROY, W. K. A toxicity testing system for exposing small invertebrates and fish to short square-wave concentrations of chlorine. **Water Research**, v. 15, n. 7, p. 923-927, 1981.

McLARNON-RICHES, C. J.; ROLPH, C. E.; GREENWAY, D. L. A.; ROBINSON, P. K. Effects of environmental factors and metals on *Selenastrum capricornutum* lipids. **Phytochemistry**, v. 49, n. 5, p. 1241-1247, 1998.

MICROCAL ORIGIN. Origin Version 5.0. Microcal Software, Inc: Northampton, MA, USA.1997.

NISHINO, S. F.; SPAIN, J. C.; ZHONGQI, H. E Strategies of aerobic degradation of nitroaromatic compounds by bacteria: process discovery to field application. In: SPAIN, J. C.; HUGHES, J. B.; KNACKMUSS, H. J. **Compounds and explosives**. Boca Raton: CRC Press, 2000. Cap. 2, 2006.

NOVELLI, A **Estudo limnológico e ecotoxicológico da água e sedimento do Rio Monjolinho – São Carlos (SP), com ênfase nas substâncias de referência cádmio e cobre**. 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia Ambiental) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.

OIKARI, A.; LO'NN, B.-E.; CASTRE'N, M.; NAKARI, T.; SNICKARS-NIKINMAA, B.; BISTER, H.; VIRTANEN, E. Toxicological effects of dehydroabietic acid (DHAA) on the trout, *Salmo gairdneri* Richardson, in fresh water. **Water Research**, v. 17, p. 81–89. 1983.

PAIVA, T.C.B; SILVA, R.C.; SANTOS, L.F.; MORAES, S.G.; DURÁN, N.; SILVA, F. T. Characterization of the pulping and bleaching effluents from a nitrocellulose industry and their environmental impact. In: **11th ITERNATIONAL SYMPOSIUM ON WOOD AND PULPING CHEMISTRY**. 2001, Nice, France.

PASCOE, D.; WENZEL, A.; JANSSEN, C.; GIRLING, A.E.; JÜTTNER, I.; FLIEDNER, A.; BLOCKWELL, S.J.; MAUND, S.J.; TAYLOR, E.J.; M. DIEDRICH, M.; PERSOONE, G.; VERHELST, P.; STEPHENSON, R.R.; CROSSLE, N.O.; MITCHELL, G.C.; PEARSON, N.; TATTERSFIELD, L.; LAY, J.P.; PEITHER, A.; B. NEUMEIER, B. E VELLETTI, A.R. The development of toxicity tests for freshwater pollutants e their validation in stream e pond mesocosms. **Water. Research**, v. 34, n 8,: p. 2323-2329, 2000.

PEARSON, J. G.; GLENNON, J. P.; BARKLEY, J. J.; HIGHFILL, J. W. **An approach to the toxicological evaluation of a complex industrial wastewater**. **Aquatic Toxicology** ASTM, 1979. (STP 667:284-301).

PELCZAR, M. J. **Microbiologia**. Pearson Education do Brasil LTDA, 1996. 556 p.

PILLINGER, J. M.; COOPER, J. A. e RIDGE, I. Role phenolic compounds in the antialgal activity of barley straw. **Journal of Chemical Ecology**, v. 20, n. 7, p. 1557-1569, 1994.

PENGE, G.; ROBERTS, J. C. Solubility and toxicity of resin acids. **Water Research**, v. 34, n. 10, p. 2779-2785, 2000.

PENNINGTON, J. C.; BRANNON, J. M. Environmental fate of explosives. **Thermochemica Acta**, v.384, p.163-172, 2002.

QUEIROZ, S. O. P. Metodos para avaliação de salinização do solo sob condições de ambiente protegido. 2004. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) – Faculdade de Engenharia Agrícola, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

RAMOS, E. U.; VAAL, M. A.; HERMENS, J. L. M. Interspecies sensitivity in the aquatic toxicity of aromatic amines. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 11, p. 149-158, 2002.

RAND, G. M.; WELLS, P. G.; McCARTHY, L. S. Introduction to aquatic toxicology. In: Rand, G. M. **Fundamentals of Aquatic Toxicology. Effects, environmental fate and risk assessment**. 2nd. Washington D.C.: Taylor & Francis, 1995. C. 1, p. 3-67.

RAND, G. M.; PETROCELLI, S. R. Introduction. In: RAND, G. M.; PETROCELLI, S. R., **Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications**, New York: Hemisphere, 1985. p.1-28.

REGINATTO, V. **Avaliação do ensaio de toxicidade com a alga *Scenedesmus subspicatus* para o estudo de efluentes industriais**. 1998. 105 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1998.

RIGOL, A.; LACORTE, S.; BARCELÓ, D. Sample handling and analytical protocols for analysis of resin acids in process waters and effluents from pulp and paper mills. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 10, 2003.

RIVA, M. C.; LÓPEZ, D. Impacto ambiental de los efluentes del proceso de blanqueo de algodón: parámetros químicos y biológicos. **Boletín Intextor** (U.P.C.), n. 119, 2001.

ROCHA, O.; GUNTZEL, A. Crustacea Branchiopoda. In: ISMAEL, D.; VALENTE, W. C.; TUNDISI, T. M. E ROCHA, O. **Invertebrados de água doce**. São Paulo, p. 109-120. 1999.

RODGERS, D. W.; SCHRODER, J.; VERECKEN, S. L. Comparison of *Daphnia magna*, rainbow trout and bacterial-based toxicity tests of Ontario Hydro aquatic effluents. **Water, Air and soil Pollution**, v. 90, p. 105-112, 1996.

RODRIGUES, M.B. **Tratamento de efluentes proveniente da fabricação de TNT de uma indústria de explosivos utilizando processos redutivos e oxidativos avançados**. 2005. 132 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo. 2005.

ROJIEKOVÁ-PADRTOVÁ, R.; MARŠÁLEK, B.; HOLOUBEK, I. Evaluation of alternative E stEard toxicity assays for screening of environmental samples: selection of an optimal test battery. **Chemosphere**, v. 37, n 3, p. 495-507, 1998.

ROJIEKOVÁ-PADRTOVÁ, R.; MARŠÁLEK, B. Selection and sensitivity comparisons of algal species for toxicity testing. **Chemosphere**, v. 38, n. 14, p. 3329-3338, 1999.

RONCO, A.; BAEZ, M. C. D. Interpretación y manejo de resultados. In: In: CASTILLO, G. Ensayos toxicologicos y metodos de evaluación de calidad de aguas. Editora: IDRC/IMTA, 2004. Cap. 7. p. 202.

RYON, M. G. **Water quality criteria for nitrocellulose**: Final Report. Fort Frederick, Frederick: Oak ridge National Laboratory, 1986.216 p. (AD-A145 417).

RYON, G. M.; PAL, C. B.; TALMAGE, S. S.; ROSS, R. H. **Database assessment of the health and environmental effects of munition production waste products**. Fort Frederick, Frederick: Oak Ridge National Laboratory, 1984. 82 p. (AD ORNL-6179)

SAKEVICH, A. I.; KIRPENKO, N. I.; MEDVED, V. A.; USENKO, O. M.; GORBUNOVA, Z. N. Influence of polyphenols of higher aquatic plants on the functional activity of plankton algae. **Hydrobiological Journal**, v. 41, n. 6, p. 99-110, 2005.

SCHMITZ, R. P.H.; EISENTRÄGER, A.; DOTT, W. Miniaturized kinetic growth inhibition assays with *Vibrio fischeri* and *Pseudomonas putida* (application, validation and comparison). **Journal of Microbiological Methods**, v. 31, p. 159-166, 1998.

SANTOS, L. F. **Sistemas de lodos ativados aplicados no tratamento de efluentes oriundos das etapas de fabricação de nitrocelulose**. 2001. 103 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial).- Departamento de Biotecnologia, Lorena, 2001.

SANTOS, L. F. **Caracterização e tratamento de efluentes da fabricação de nitrocelulose**. 2006. 102 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial).- Departamento de Biotecnologia, Lorena, 2006.

SÃO PAULO. Secretaria de Estado do Meio Ambiente. Aprova o Regulamento da Lei nº 997, de 31 de maio de 1976. Decreto 8.468, de 8 de setembro de 1976. **Diário Oficial do Estado**, São Paulo, p. , 1976.

SÃO PAULO. Secretaria de Estado do Meio Ambiente. Resolução SMA-3, 22 de fevereiro de 2000. **Diário Oficial do Estado**, São Paulo, p. 24, março, 2000.

SÁNCHEZ-BAYO, F. Comparative acute toxicity of organic pollutants and reference values for crustaceans. I. Branchiopoda, Copepoda and Ostracoda. **Environmental Pollution**, v 139, p. 385-420, 2006.

SARLAUSKAS, J.; NEMEIKAITECÈNIENE-N, A.; ANUSEVICIUS, Z.; MISEVICIENÈ, L.; JUELVEZ, M.M.; GOMEZ-MORENO; CENAS, N. Flavoenzyme-catalyzed redox cycling of hydroxilamino- and amino metabolites of 2,4,6-trinitrotolueno: implications for their cytotoxicity. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, xxx., xxx-xxx, 2004.

SCHACKMANN, A.; MULLER, R. Reduction of nitroaromatic compounds by different (pseudomonas) species under aerobic conditions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 34, p.809-813, 1991.

SCHIMITT, M.; GELLERT, G.; LUDWIG, J.; LICHTENBERG-FRATÉ, H. Phenotypic yeast growth analysis for chronic toxicity testing. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.59, p.142-150, 2004.

SEPIC, E.; BRICELJ, M.; LESKOVSEK, H. Toxicity of fluorantene and its biodegradation metabolites to aquatic organisms. **Chemosphere**, v. 52, p. 1125-1133, 2003.

SEPÚLVEDA, M. S.; JOHNSON, W. E.; HIGMAN, J. C.; DENSLOW, N. D.; SCHOEB, T. R.; GROSS, T. S. An evaluation of biomarker of reproductive function and potential contaminant effects in Florida largemouth bass (*Micropterus salmoides floridanus*) sampled from the St. Johns River. **The Science of the Total Environment**, v. 289, p. 133-144, 2002.

SHEREVE, R. M.; BRINK JUNIOR, J. Explosivos, agentes químicos tóxicos e propelentes. In: SHEREVE, R. M.; BRINK JUNIOR, J. **Indústrias de processos químicos**. Guanabara Koogan, 1997, p. 312-325.

SLABBERT, J. L. AND VENTER, E. A. Biological assays for aquatic toxicity testing. **Water Science and Technology**, v. 39, n. 10-11, p. 367-373, 1999.

SLABBERT, J. L. Microbial toxicity assays used for water quality evaluation in South Africa. **Toxicity Assessment: An International Journal**, v. 3, p. 101-115, 1988.

SLABBERT, J. L. Improved bacterial growth test for rapid water toxicity screening. **Bulletin of Environmental Contamination Toxicology**, v. 37, p. 565-569, 1986.

SMOCK, L. A.; STONEBURNER, D. L.; CLARK, J. R. The toxicity of trinitrotoluene (TNT) and its primary degradation products on two species of algae and the fathead minnow. **Water Research**, v. 10, p. 537-543, 1976.

SPAIN, C. J. Biodegradation of nitroaromatic compounds. **Annu. Rev. Microbiology**, v. 49, p. 523-555, 1995.

SPANGGORD, R. J., MABEY, W. R., CHOU, T. W. Environmental fate of selected nitroaromatic compounds in the aquatic environment. In: RICKERT, D.E. **Chemical Industry Institute of Toxicology Series: Toxicity of Nitroaromatic Compounds**. Washington, DC: Hemisphere Publishing Corp., 1985. p. 15-34.

SPONZA, D.T. Application of toxicity tests into discharges of the pulp-paper industry in Turkey. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 54, p.74-86, 2003.

STILWELL, J. M.; COOPER, D.C.; EISCHEN, M. A.; MATTHEWS, M. C.; SHERWOOD, B. E.; STANFORD, T. B. **Aquatic Life Field Studies at Joliet Army Ammunition Plant. Final Phase II**. Battelle's Columbus Laboratories: Columbus, 1976. (AD A033 548).

STUCKI, H. Toxicity and degradation of explosives. **Chimia**, v. 58, n. 6, p. 409-413, 2004.

SUMATHI, S. e HUNG, YUNG-TSE. Treatment of pulp and paper mill wastes. In: WANG, K. L.; HUNG, Y.-T.; LO, H. H.; YAPIJAKIS, C. **Handbook of industrial and hazardous wastes treatment**. New York: Marcel Dekker, 2004. C. 10, p. 469-485.

TADROS, M. G.; CRAWFORD, A.; MATEO-SULLIVAN, A.; ZHANG, C.; HUGHES, J. B. Toxic effects of hydroxylamino intermediates from microbial transformation of trinitrotoluene and dinitrotoluenes on algae *Selenastrum capricornutum*. **Bulletin Environmental Contamination Toxicology**, v. 64, p. 579-585, 2000.

TALMAGE, S. S.; OPRESKO, D. M.; MAXWELL, C. J.; WELSH, C. J. E.; CRETELLA, F. M.; RENO, P. H.; DANIEL, F. B. Nitroaromatic munition compounds: environmental effects and screening values. **Reviews of Environmental Contamination Toxicology**. v. 161, p. 1-156, 1999.

TAM, T.-Y; TREVORS, J.T. Toxicity of pentachlorophenol to *Azotobacter vinelandii*, **Bull. Environmental. Contamination Toxicology**, v. 27, p. 230, 1981.

THOMPSON, G.; SWAIN, J.; FORSTER, C. F. The treatment of pulp E paper mill effluent: a review. **Bioresource Technology**, v. 77, p.275-286, 2001.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, L. C. **Microbiologia**. 6 ed. Porto Alegre/RS: Manole, 2000. 827p.

TREVORS, J. T. Bacterial growth and activity as indicators of toxicity. In: BITTON, G. E DUTKA, B. J. **Toxicity testing using microorganisms**. Boca Raton, Flórida: CRC Press, 1986. C. 2, p. 14-16.

UNITED STATES DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. **Compilation of Air Pollutant Emission Factors**. AP-42. 5nd. cap. 3. 1995a. Disponível em: <www.epa.gov/ttn/chief/ap42/ch06/final/c06s03.pdf>

UNITED STATES DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. Public Health Service. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. **Toxicological Profile for 2,4,6-Trinitrotoluene**, 176 p. 1995b.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Methods for mesuaring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organisms**. EPA/600/4-85/013, 3nd. 1985.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **A linear interpolation method for sublethal toxicity: the inhibition concentration – ICP – Versão 2.0**. Environmental Research Laboratory. Duluth, 1993.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Organic Chemical Processes Industry. Ap-42. 50 ed. v. 1. 1983. Disponível em www.epa.gov/ttn/chief/ap42/ch06/final/c06s03.pdf

VAAL, M.; VAN DER WAL, J. T.; HERMENS, J.; HOEKSTRA, J. Pattern analysis of the variation in the sensitivity of aquatic species to toxicants. **Chemosphere**, v. 35, n. 6, p. 1291-1309, 1997a.

VAAL, M.; van der WAL, J. T.; HOEKSTRA, J.; HERMENS, J. Variation in the sensitivity of aquatic species in relation to the classification of environmental pollutants. **Chemosphere**, v. 35, n. 6, p. 1311-1327, 1997b.

VAN DER SCHALIE, W. H. **The acute and chronic toxicity of 3,5-dinitroaniline, 1,3-dinitrobenzene and 1,3,5-trinitrobenzene to freshwater aquatic organisms**. Fort Frederick, Frederick: US Army Medical Research and Development Command, 1983. 53 p. (ADA 138408).

VETRANO, K. M. Molecular Chlorine: health and environmental effects. **Reviews of Environmental Contamination**, v. 170, p. 75-140, 2001.

VERTEEG, D. J.; STALMANS, M.; DYER, S.D.; JANSSEN, C. *Ceriodaphnia* and *Daphnia*: a comparison of their sensitivity to xenobiotics and utility as a test species. **Chemosphere**, v. 34, p. 869-892, 1997.

VIDOTTI, E. C.; ROLLEMBERG, M. C. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à biorremediação e a química analítica. *Química Nova*, v. 27, n. 1, 2004.

VILLEGAS-NAVARRO, A.; RAMÍREZ, Y. M.; SALVADOR, S. S.; GALLARDO, J. M. Determination of wastewater LC₅₀ of the different process stages of the textile industry. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 48, p. 56-61, 2001.

WALSH, G.; DUKE, K.M.; FOSTER, R.B. Algae and crustaceans as indicators of bioactivity of industrial wastes. **Water Research**, v. 16, p. 879-883, 1982.

WILSON, A. J.; MOORE, E. R. B.; MOHN, W. W. Isolation and characterization of isopimaric acid-degrading bacteria from a sequencing batch reactor. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 3146-3151, 1996.

WON, W.; HECKLY, R.; GLOVER, D.; HOFFSOMMER, J. Metabolic disposition of 2,4,6-trinitrotoluene. **Applied Microbiology**, v. 27, p. 513-516, 1974.

WON, W. D.; DiSALVO, L. H. NG. J. Toxicity and mutagenicity of 2,4,6-trinitrotoluene and its microbial metabolites. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 31, n. 4, p. 576-580, 1976.

YAKOVLEVA, Y. N.; OSTROVSKAYA, R. M.; NOVIKOVA, L. N. Assessment of genotoxicity of lignin substances as risk factors for aquatic ecosystems. **Russian Journal of Ecology**, v. 35, n. 4, 2004. falta página

YOO, L. J.; LOTUFO, G. R.; BIBSON, A. B.; STEEVENS, J. A.; SIMS, J. G. Toxicity and bioaccumulation of 2,4,6-trinitrotoluene in fathead minnow (*Pimephales promelas*). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 25, n. 12, p. 3253-3260, 2006.

ZAGATTO, P. A. Ecotoxicologia. In: ZAGATTO, P. A. e BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática Princípios e Aplicações**. São Carlos: Rima Editora, 2006. p. 1-13.

_____. Sensibilidade de *Daphnia similis*: controle de qualidade das culturas. **Ambiente**, v. 2, n. 2, p. 79-83, 1988.

ZANELLA, E. Effect of pH on acute toxicity of dehydroabiatic acid and chlorinated dehydroabiatic acido in fish and *Daphnia*. **Bulletin of Environmental Contamination Toxicology**, v. 30, p. 133-144, 1983.

ZARGAR, S.; GHOSH, T. K. Thermal and biocidal (chlorine) effects on select freshwater plankton. **Archives Environmental Contamination and Toxicology**, v. 53, p. 191–197, 2007.

ZARIPOV, S. A.; NAUMOV, A. V.; ABDRAKHMANOVA, J. F.; GARUSOV, A. V.; NAUMOVA, R. P. Models of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) initial conversion by yeasts. **Microbiology Letters**, v. 217, p. 213-217, 2002.

ZENG, K.; HWANG, H-M., ZHANG, Y.; COOK, S. Assessing cytotoxicity of photosensitized transformation products of 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT) and atrazine with freshwater microbial assemblages. **Environmental Toxicology**, v. 19, n. 5, p. 490-496, 2004.

APÊNDICE A

Dados de imobilidade dos ensaios de toxicidade aguda com *D. similis* (48 h)

Efluentes da produção do 2,4,6-TNT.

Água Amarela 17 a 19/08/06			Água Vermelha 23 a 25/05/06		
Diluições (%)	Imobilidade (%)	DP	Diluições (%)	Imobilidade (%)	DP
0	2	1,0	0	10	0,5
0,50	20	0,8	0,25	45	0,5
0,75	75	1,5	0,50	70	0,6
1,00	100	0	1,00	70	0,6
2,00	100	0	2,00	90	2,3
4,00	100	0	4,00	95	0

AA+AV 17 a 19/08/06		
Diluições (%)	Imobilidade (%)	DP
0	0	0
0,10	0	0,5
0,20	15	1,0
0,40	50	0,5
0,80	95	0,9
1,60	100	0

Legenda: Desvio Padrão das replicatas (DP)

Efluentes da Produção da nitrocelulose.

Designificação 04 a 06/10/06			Branqueamento 11 a 13/05/06		
Diluições (%)	Imobilidade (%)	DP	Diluições (%)	Imobilidade (%)	DP
0	0	0,0	0	0	0
0,06	0	0,0	0,05	100	0
0,12	10	1,0	0,10	100	0
0,25	55	0,5	0,20	100	0
0,50	100	2,5	0,40	100	0
1,00	100	0,0	0,50	100	0

Nitração 17 a 19/10/06			Mistura 05 a 07/12/06		
Diluições (%)	Imobilidade (%)	DP	Diluições (%)	Imobilidade (%)	DP
0	0	0,0	0	10	0
5	0	0,0	0,75	0	0
10	10	0,6	1,50	10	1,0
15	15	0,5	2,30	30	1,3
20	35	1,5	3,00	75	1,9
40	100	0,0	6,00	100	0

Legenda: Desvio Padrão das replicatas (DP)

APÊNDICE B

Dados de mortalidade com *Danio rerio* (48 h)

Efluente da produção da nitrocelulose

Água Amarela - 05 a 07/06/07		Água vermelha - 05 a 07/06/07	
Concentração %	No de org. mortos	Concentração %	No de org. mortos
controle	0	controle	0
0,4	2	0,05	0
0,5	6	0,1	0
0,6	10	0,2	1
0,7	10	0,4	6
0,8	10	0,8	10

A. amarela + a. vermelha - 26 a 28/06/07	
Concentração %	No de org. mortos
controle	0
0,5	0
0,6	1
0,7	1
0,8	8
0,9	10

Efluente produção TNT

Branqueamento - 08 a 10/05/07		Deslignificação - 08 a 10/05/07	
Concentração %	No de org. mortos	Concentração %	No de org. mortos
Controle	0	controle	0
0,1	10	1,6	0
0,2	10	1,98	1
0,4	10	2,35	5
0,8	10	2,7	10
1,6	10	3,1	10

Nitração - 08 a 10/05/07		Mistura - 26 a 28/06/07	
Concentração %	No de org. mortos	Concentração %	No de org. mortos
controle	0	controle	0
50	0	3,1	0
62,5	0	3,9	1
75	1	4,7	7
87,5	7	5,5	10
100	10	6,2	10

APÊNDICE C

Dados relativos aos ensaios de toxicidade aguda com *E. coli**Efluente água Amarela*

Conc. %	Branco	Diluição	Resultado 1	Leitura 6 h	Diluição	Resultado 2	Result. Final	Média	D.P.	% de Inib.	D.P. % Inib.	Média % Inib.
Controle 1	0,034	0,0	0,034	0,670	01:02	2,010	1,976	1,893	0,07	0	0	0
Controle 2	0,034	0,0	0,034	0,629	01:02	1,887	1,853			0		0
Controle 3	0,034	0,0	0,034	0,628	01:02	1,884	1,850			0		0
2,31	0,030	0,0	0,030	0,195	01:02	0,585	0,555	0,590	0,11	70,68	5,70	68,83
2,31	0,030	0,0	0,030	0,247	01:02	0,741	0,711			62,44		
2,31	0,030	0,0	0,030	0,178	01:02	0,534	0,504			73,38		
1,93	0,031	0,0	0,031	0,532	01:02	1,596	1,565	1,206	0,32	17,33	16,88	50,00
1,93	0,031	0,0	0,031	0,377	01:02	1,131	1,100			41,89		
1,93	0,031	0,0	0,031	0,328	01:02	0,984	0,953			49,66		
1,6	0,032	0,0	0,032	0,340	01:02	1,020	0,988	0,818	0,17	47,81	8,80	52,48
1,6	0,032	0,0	0,032	0,229	01:02	0,687	0,655			65,40		
1,6	0,032	0,0	0,032	0,281	01:02	0,843	0,811			57,16		
0,8	0,032	0,0	0,032	0,406	01:02	1,218	1,186	1,045	0,12	37,35	6,56	44,80
0,8	0,032	0,0	0,032	0,343	01:02	1,029	0,997			47,33		
0,8	0,032	0,0	0,032	0,328	01:02	0,984	0,952			49,71		
0,4	0,049	0,0	0,049	0,460	01:02	1,380	1,331	1,299	0,04	29,69	2,04	31,38
0,4	0,049	0,0	0,049	0,453	01:02	1,359	1,310			30,80		
0,4	0,049	0,0	0,049	0,435	01:02	1,305	1,256			33,65		

Efluente água amarela + água vermelha

Conc. %	Branco	Diluição	Resultado 1	Leitura 1 - 24 h	Diluição	Resultado 2	Result. Final	Média	D.P.	% de Inib.	D.P. % Inib.	Média % Inib.
Controle 1	0,030	0,0	0,030	0,584	01:02	1,752	1,722	1,678	0,04	0	0	0
Controle 2	0,030	0,0	0,030	0,563	01:02	1,689	1,659			0		
Controle 3	0,030	0,0	0,030	0,561	01:02	1,683	1,653			0		
3,1	0,192	0,0	0,192	0,211	00:00	0,211	0,019	0,016	0,00	98,87	0,23	99,03
3,1	0,192	0,0	0,192	0,204	00:00	0,204	0,012			99,28		
3,1	0,192	0,0	0,192	0,210	00:00	0,210	0,018			98,93		
1,6	0,121	0,0	0,121	0,129	00:00	0,129	0,008	0,007	0,00	99,52	0,09	99,60
1,6	0,121	0,0	0,121	0,126	00:00	0,126	0,005			99,70		
1,6	0,121	0,0	0,121	0,128	00:00	0,128	0,007			99,58		
0,8	0,075	0,0	0,075	0,562	00:00	0,562	0,487	0,674	0,26	70,98	15,76	59,83
0,8	0,075	0,0	0,075	0,936	00:00	0,936	0,861			48,69		
0,8	0,075	0,0	0,075	0,103	00:00	0,103	0,028			98,33		
0,4	0,046	0,0	0,046	0,560	01:02	1,680	1,634	1,564	0,10	2,62	5,94	6,82
0,4	0,046	0,0	0,046	0,513	01:02	1,539	1,493			11,03		
0,4	0,046	0,0	0,046	0,127	00:00	0,127	0,081			95,17		
0,2	0,041	0,0	0,041	0,550	01:02	1,650	1,609	1,551	0,07	4,11	5,10	5,18
0,2	0,041	0,0	0,041	0,504	01:02	1,512	1,471			12,34		
0,2	0,041	0,0	0,041	0,538	01:02	1,614	1,573			6,26		

Efluente do Branqueamento:

Conc. %	Branco	Diluição	Resultado 1	Leitura 1 - 24 h	Diluição	Resultado 2	Result. Final	Média	D.P.	% de Inib.	D.P. % Inib.	Média % Inib.
Controle 1	0,025	0,0	0,025	0,726	01:02	2,178	2,153	2,117	0,03	0	0	0
Controle 2	0,025	0,0	0,025	0,712	01:02	2,136	2,111			0		
Controle 3	0,025	0,0	0,025	0,704	01:02	2,112	2,087			0		
50	0,035	0,0	0,035	0,387	00:00	0,387	0,352	0,398	0,15	83,37	7,24	78,25
50	0,035	0,0	0,035	0,604	00:00	0,604	0,569			73,12		
50	0,035	0,0	0,035	0,308	00:00	0,308	0,273			87,10		
40	0,034	0,0	0,034	0,967	00:00	0,967	0,933	0,836	0,11	55,93	5,00	60,51
40	0,034	0,0	0,034	0,886	00:00	0,886	0,852			59,75		
40	0,034	0,0	0,034	0,757	00:00	0,757	0,723			65,85		
25	0,027	0,0	0,027	0,490	01:02	1,470	1,443	1,493	0,05	31,84	2,34	30,63
25	0,027	0,0	0,027	0,507	01:02	1,521	1,494			29,43		
25	0,027	0,0	0,027	0,523	01:02	1,569	1,542			27,16		
12,5	0,025	0,0	0,025	0,470	01:02	1,410	1,385	1,439	0,10	34,58	4,67	32,03
12,5	0,025	0,0	0,025	0,468	01:02	1,404	1,379			34,86		
12,5	0,025	0,0	0,025	0,526	01:02	1,578	1,553			26,64		
6,2	0,027	0,0	0,027	0,554	01:02	1,662	1,635	1,399	0,22	22,77	9,42	29,43
6,2	0,027	0,0	0,027	0,460	01:02	1,380	1,353			36,09		
6,2	0,027	0,0	0,027	0,412	01:02	1,236	1,209			42,89		

Efluente da nitração:

Conc. %	Branco	Diluição	Resultado 1	Leitura 1 - 24 h	Diluição	Resultado 2	Result. Final	Média	D.P.	% de Inib.	D.P. % Inib.	Média % Inib.
Controle 1	0,034	0	0,034	0,697	01:02	2,091	2,057	2,086	0,05	0	1,76	
Controle 2	0,034	0	0,034	0,724	01:02	2,172	2,138			-2,49		
Controle 3	0,034	0	0,034	0,699	01:02	2,097	2,063			1,10		
80	0,082	0	0,082	0,777	01:02	2,331	2,249	2,283	0,03	-7,81	1,94	
80	0,082	0	0,082	0,796	01:02	2,388	2,306			-10,55		
80	0,082	0	0,082	0,792	01:02	2,376	2,294			-9,97		
53	0,063	0	0,063	0,818	01:02	2,454	2,391	2,477	0,09	-14,62	4,50	
53	0,063	0	0,063	0,842	01:02	2,526	2,463			-18,07		
53	0,063	0	0,063	0,88	01:02	2,64	2,577			-23,54		
40	0,052	0	0,052	0,859	01:02	2,577	2,525	2,465	0,05	-21,05	2,51	
40	0,052	0	0,052	0,831	01:02	2,493	2,441			-17,02		
40	0,052	0	0,052	0,827	01:02	2,481	2,429			-16,44		
27	0,051	0	0,051	0,685	01:02	2,055	2,004	2,271	0,23	3,93	11,15	
27	0,051	0	0,051	0,827	01:02	2,481	2,43			-16,49		
27	0,051	0	0,051	0,81	01:02	2,43	2,379			-14,05		
20	0,049	0	0,049	0,796	01:02	2,388	2,339	2,303	0,13	-12,13	6,36	
20	0,049	0	0,049	0,821	01:02	2,463	2,414			-15,72		
20	0,049	0	0,049	0,735	01:02	2,205	2,156			-3,36		

Efluente da mistura:

Conc. %	Branco	Diluição	Resultado 1	Leitura 1 - 24 h	Diluição	Resultado 2	Result. Final	Média	D.P.	% de Inib.	D.P. % Inib.	Média % Inib.
Controle 1	0,032	0,0	0,032	0,735	01:02	2,205	2,173	2,021	0,20	0		0
Controle 2	0,032	0,0	0,032	0,707	01:02	2,121	2,089			0		
Controle 3	0,032	0,0	0,032	0,611	01:02	1,833	1,801			0		
6,2	0,287	0,0	0,287	0,405	01:02	1,215	0,928	0,639	0,48	54,08	0,73	54,60
6,2	0,287	0,0	0,287	0,398	01:02	1,194	0,907			55,12		
6,2	0,287	0,0	0,287	0,123	01:02	0,369	0,082			95,94		
3,1	0,156	0,0	0,156	0,368	01:02	1,104	0,948	0,972	0,06	53,09	2,86	51,90
3,1	0,156	0,0	0,156	0,362	01:02	1,086	0,930			53,98		
3,1	0,156	0,0	0,156	0,398	01:02	1,194	1,038			48,64		
1,6	0,090	0,0	0,090	0,368	01:02	1,104	1,014	1,056	0,05	49,83	2,53	47,75
1,6	0,090	0,0	0,090	0,401	01:02	1,203	1,113			44,93		
1,6	0,090	0,0	0,090	0,377	01:02	1,131	1,041			48,49		
0,8	0,067	0,0	0,067	0,500	01:02	1,500	1,433	1,501	0,10	29,09	4,96	25,73
0,8	0,067	0,0	0,067	0,507	01:02	1,521	1,454			28,06		
0,8	0,067	0,0	0,067	0,561	01:02	1,683	1,616			20,04		
0,4	0,048	0,0	0,048	0,660	01:02	1,980	1,932	1,975	0,06	4,40	0,84	2,28
0,4	0,048	0,0	0,048	0,668	01:02	2,004	1,956			3,22		
0,4	0,048	0,0	0,048	0,695	01:02	2,085	2,037			-0,79		

APÊNDICE D

Dados relativos aos ensaios de toxicidade aguda com *P. putida*

Efluente água amarela

Conc. %	Branco	Diluição	Resultado 1	Leitura 1 - 24 h	Diluição	Resultado 2	Result. Final	Média	D.P.	% de Inib.	D.P. % Inib.	Média % Inib.
Controle 1	0,021	0	0,021	0,406	1/2	1,22	1,197	1,181	0,02	0	0	0
Controle 2	0,021	0	0,021	0,393	1/2	1,18	1,158			0		
Controle 3	0,021	0	0,021	0,403	1/2	1,21	1,188			0		
50	0,062	0	0,062	0,077	0,0	0,296	0,234	0,236	0,00	80,186	0,34	79,99
50	0,062	0	0,062	0,117	0,0	0,296	0,234			80,186		
50	0,062	0	0,062	0,115	0,0	0,303	0,241			79,594		
40	0,210	0	0,210	0,176	0,0	0,808	0,598	0,554	0,12	49,365	10,10	53,09
40	0,210	0	0,210	0,117	0,0	0,956	0,746			36,833		
40	0,210	0	0,210	0,125	0,0	0,720	0,510			56,816		
25	0,131	0	0,131	0,200	0,0	0,761	0,630	0,648	0,02	46,655	1,66	45,10
25	0,131	0	0,131	0,117	0,0	0,777	0,646			45,301		
25	0,131	0	0,131	0,113	0,0	0,800	0,669			43,353		
12,5	0,103	0	0,103	0,790	0,0	0,898	0,795	0,798	0,02	32,684	1,71	32,40
12,5	0,103	0	0,103	0,855	0,0	0,883	0,780			33,954		
12,5	0,103	0	0,103	0,762	0,0	0,923	0,820			30,567		
6,2	0,072	0	0,072	0,936	0,0	0,950	0,878	0,89	0,02	25,656	1,99	25,63
6,2	0,072	0	0,072	1,067	0,0	0,927	0,855			27,60		
6,2	0,072	0	0,072	1,014	0,0	0,974	0,902			23,62		

Efluente água amarela + água vermelha

Conc. %	Branco	Diluição	Resultado 1	Leitura 1 - 24 h	Diluição	Resultado 2	Result. Final	Média	D.P.	% de Inib.	D.P. % Inib.	Média % Inib.	CV
Controle 1	0,041	0	0,041	0,391	1/2	1,173	1,132	1,141	0,02	0	0	0	0,02
Controle 2	0,041	0	0,041	0,403	1/2	1,209	1,168			0			
Controle 3	0,041	0	0,041	0,388	1/2	1,164	1,123			0			
20	0,608	0	0,608	0,642	0,642	0,034	-0,574	-0,574	0,00	150,31	0,13	150,34	0,09
20	0,608	0	0,608	0,643	0,643	0,035	-0,573			150,22			
20	0,608	0	0,608	0,640	0,640	0,032	-0,576			150,48			
10	0,310	0	0,310	1,062	1,062	0,752	0,442	0,514	0,08	61,26	7,21	54,95	13,12
10	0,310	0	0,310	1,065	1,065	0,755	0,445			61,00			
10	0,310	0	0,310	1,206	1,206	0,896	0,586			48,64			
7,3	0,225	0	0,225	1,110	1,110	0,885	0,660	0,687	0,03	42,16	2,50	39,76	6,30
7,3	0,225	0	0,225	1,167	1,167	0,942	0,717			37,16			
7,3	0,225	0	0,225	1,135	1,135	0,910	0,685			39,96			
5,0	0,180	0	0,180	0,385	1/2	1,155	0,975	0,984	0,04	14,55	3,88	13,76	28,17
5,0	0,180	0	0,180	0,363	1/2	1,089	0,909			20,33			
5,0	0,180	0	0,180	0,391	1/2	1,173	0,993			12,97			
2,5	0,112	0	0,112	0,382	1/2	1,146	1,034	1,07	0,04	9,38	3,64	9,38	38,85
2,5	0,112	0	0,112	0,382	1/2	1,146	1,034			9,38			
2,5	0,112	0	0,112	0,406	1/2	1,218	1,106			3,07			

Efluente da nitração – ensaio preliminar – não causou inibição

Conc. %	Branco	Diluição	Resultado 1	Leitura 1 - 24 h	Diluição	Resultado 2	Result. Final	% Inib
Controle 1	0,022	0	0,022	0,342	01:02	1,026	1,004	0
87,3	0,057	00:00	0,057	0,32	01:02	0,96	0,903	10,06
73	0,067	00:00	0,067	0,333	01:02	0,999	0,932	7,17
50	0,071	0	0,071	0,367	01:02	1,101	1,03	-2,59
25	0,056	0	0,056	0,396	01:02	1,188	1,132	-12,75
12,5	0,05	0	0,05	0,392	01:02	1,176	1,126	-12,15

Efluente do Branqueamento

Conc. %	Branco	Diluição	Resultado 1	Leitura 1 - 24 h	Diluição	Resultado 2	Result. Final	Média	D.P.	% de Inib.	D.P. % Inib.	Média % Inib.	CV
Controle 1	0,023	0	0,023	0,363	01:02	1,09	1,066	1,04	0,03	0	0	0	0,03
Controle 2	0,023	0	0,023	0,341	01:02	1,02	1			0			
Controle 3	0,023	0	0,023	0,358	01:02	1,07	1,051			0			
87,5	0,051	0	0,051	0,286	0	0,286	0,235	0,24	0,01	77,38	1,3	77,35	0,02
87,5	0,051	0	0,051	0,3	0	0,3	0,249			76,03			
87,5	0,051	0	0,051	0,273	0	0,273	0,222			78,63			
80	0,054	0	0,054	0,338	0	0,338	0,284	0,33	0,06	72,67	5,58	68,11	0,08
80	0,054	0	0,054	0,368	0	0,368	0,314			69,78			
80	0,054	0	0,054	0,45	0	0,45	0,396			61,89			
73	0,049	0	0,049	0,608	0	0,608	0,559	0,52	0,04	46,2	3,51	49,7	0,07
73	0,049	0	0,049	0,535	0	0,535	0,486			53,22			
73	0,049	0	0,049	0,572	0	0,572	0,523			49,66			
60	0,043	0	0,043	0,765	0	0,765	0,722	0,72	0,01	30,51	0,48	30,51	0,02
60	0,043	0	0,043	0,77	0	0,77	0,727			30,03			
60	0,043	0	0,043	0,76	0	0,76	0,717			30,99			
50	0,036	0	0,036	0,836	0	0,836	0,8	0,79	0,05	23	2,45	23,58	0,10
50	0,036	0	0,036	0,872	0	0,872	0,836			19,54			
50	0,036	0	0,036	0,782	0	0,782	0,746			28,2			

Efluente da mistura

Conc. %	Branco	Diluição	Resultado 1	Leitura 1 - 24 h	Diluição	Resultado 2	Result. Final	Média	D.P.	% de Inib.	D.P. % Inib.	Média % Inib.
Controle 1	0,021	0	0,021	0,4	01:02	1,2	1,179	1,167		0	0	0
Controle 2	0,021	0	0,021	0,381	01:02	1,143	1,122			0		
Controle 3	0,021	0	0,021	0,407	01:02	1,221	1,2			0		
50	0,772	01:02	2,316	1,202	01:02	3,606	1,29	1,257		-10,54		
50	0,772	01:02	2,316	1,18	01:02	3,54	1,224			-4,88		
50	0,772	01:02	2,316	1,191	01:02	3,573	1,257			-7,71		
25	1,219	0	1,219	0,837	01:02	2,511	1,292	1,321		-10,71		
25	1,219	0	1,219	0,841	01:02	2,523	1,304			-11,74		
25	1,219	0	1,219	0,862	01:02	2,586	1,367			-17,14		
12,5	0,609	0	0,609	0,661	01:02	1,983	1,374	1,256		-17,74		
12,5	0,609	0	0,609	0,621	01:02	1,863	1,254			-7,46		
12,5	0,609	0	0,609	0,583	01:02	1,749	1,14			2,31		
6,2	0,296	0	0,296	0,506	01:02	1,518	1,222	1,177		-4,71		
6,2	0,296	0	0,296	0,504	01:02	1,512	1,216			-4,20		
6,2	0,296	0	0,296	0,463	01:02	1,389	1,093			0,00		
3,1	0,087	0	0,087	0,576	01:02	1,728	1,641	1,415		-40,62		
3,1	0,087	0	0,087	0,471	01:02	1,413	1,326			-13,62		
3,1	0,087	0	0,087	0,455	01:02	1,365	1,278			-9,51		
1,6	0,153	0	0,153	0,446	01:02	1,338	1,185	1,129		-1,54		
1,6	0,153	0	0,153	0,418	01:02	1,254	1,101			5,66		
1,6	0,153	0	0,153	0,418	01:02	1,254	1,101			5,66		

APÊNDICE E

Dados relativos aos ensaios de toxicidade aguda com *P. subcaptata**Efluente água amarela*

Diluições %	Biomassa inicial	Biomassa final	Biom. produzida	Desv. Pad	Média da biomassa	% de Inibição	D.P. % Inib.	Média % Inib.
0,80	1,58E+05	1,00E+05	-5,80E+04	28867,51	0,00E+00	101,61	0,80	101,15
0,80	1,58E+05	1,50E+05	-8,00E+03			100,22		
0,80	1,58E+05	1,00E+05	-5,80E+04			101,61		
0,40	1,58E+05	3,00E+05	1,42E+05	264648,39	6,70E+04	96,05	2,95	98,13
0,40	1,58E+05	1,50E+05	-8,00E+03			100,22		
0,20	1,58E+05	3,60E+06	3,44E+06	5431332,16	3,08E+06	4,17	6,89	14,38
0,20	1,58E+05	2,15E+06	1,99E+06			44,54		
0,20	1,58E+05	3,95E+06	3,79E+06			-5,58		
0,10	1,58E+05	3,70E+06	3,54E+06	5589008,19	3,39E+06	1,38	5,91	5,56
0,10	1,58E+05	3,40E+06	3,24E+06			9,74		
0,05	1,58E+05	3,85E+06	3,69E+06	5825528,21	4,71E+06	-2,79	19,69	0,00
0,05	1,58E+05	4,85E+06	4,69E+06			-30,64		
0,05	1,58E+05	5,90E+06	5,74E+06			-59,87		
controle 1	2,25E+05	4,25E+06	4,03E+06	6286682,63	3,59E+06	-12,06	7,87	0,00
controle 2	1,75E+05	3,75E+06	3,58E+06			0,46		
controle 3	7,50E+04	3,25E+06	3,18E+06			11,60		

Efluente água vermelha

Diluições %	Biomassa inicial	Biomassa final	Biom. produzida	Desv. Pad	Média da biomassa	% de Inibição	D.P. % Inib.	Média % Inib.
0,40	1,75E+05	1,50E+05	-2,50E+04	38188,13	8,33E+03	100,72	1,09	99,76
0,40	1,75E+05	2,25E+05	5,00E+04			98,57		
0,40	1,75E+05	1,75E+05	0,00E+00			100,00		
0,20	1,75E+05	2,75E+05	1,00E+05	62915,29	3,33E+04	97,14	1,80	99,05
0,20	1,75E+05	2,00E+05	2,50E+04			99,28		
0,20	1,75E+05	1,50E+05	-2,50E+04			100,72		
0,10	1,75E+05	3,25E+06	3,08E+06	332916,41	2,71E+06	11,93	9,53	22,43
0,10	1,75E+05	2,80E+06	2,63E+06			24,82		
0,10	1,75E+05	2,60E+06	2,43E+06			30,55		
0,07	1,75E+05	3,35E+06	3,18E+06	567890,83	3,58E+06	9,07	16,26	0,00
0,07	1,75E+05	3,50E+06	3,33E+06			4,77		
0,07	1,75E+05	4,40E+06	4,23E+06			-21,00		
0,05	1,75E+05	3,15E+06	2,98E+06	540832,69	3,58E+06	14,80	15,49	0,00
0,05	1,75E+05	3,90E+06	3,73E+06			-6,68		
0,05	1,75E+05	4,20E+06	4,03E+06			-15,27		
controle 1	2,00E+05	2,60E+06	2,40E+06	1052477,24	3,49E+06	31,26	18,73	0,00
controle 2	2,00E+05	4,70E+06	4,50E+06			-28,88		
controle 3	1,25E+05	3,70E+06	3,58E+06			-2,39		

Efluente Água amarela + água vermelha

Diluições %	Biomassa inicial	Biomassa final	Biom. produzida	Desv. Pad	Média da biomassa	% de Inibição	D.P. % Inib.	Média % Inib.
0,80	1,08E+05	3,00E+05	1,92E+05	97449,13	8,63E+04	96,11	1,97	98,25
0,80	1,08E+05	1,08E+05	0,00E+00			100,00		
0,80	1,08E+05	1,75E+05	6,70E+04			98,64		
0,40	1,08E+05	3,25E+05	2,17E+05	115092,72	8,63E+04	95,61	2,33	98,25
0,40	1,08E+05	1,50E+05	4,20E+04			99,15		
0,40	1,08E+05	1,08E+05	0,00E+00			100,00		
0,20	1,08E+05	3,25E+06	3,14E+06	929157,32	2,08E+06	36,42	18,80	58,01
0,20	1,08E+05	1,75E+06	1,64E+06			66,77		
0,20	1,08E+05	1,55E+06	1,44E+06			70,82		
0,10	1,08E+05	5,15E+06	5,04E+06	941187,19	3,96E+06	-2,02	19,04	32,38
0,10	1,08E+05	3,45E+06	3,34E+06			32,38		
0,10	1,08E+05	3,60E+06	3,49E+06			29,34		
0,05	1,08E+05	3,35E+06	3,24E+06	202072,59	3,43E+06	34,40	4,09	26,30
0,05	1,08E+05	3,50E+06	3,39E+06			31,4		
0,05	1,08E+05	3,75E+06	3,64E+06			26,3		
Controle 1	1,08E+05	3,35E+06	3,24E+06	2031624,97	4,94E+06	34,4	16,5	0
controle 2	1,08E+05	4,50E+06	4,39E+06			11,1		
controle 3	1,08E+05	7,30E+06	7,19E+06			-45,5		

Efluente branqueamento- ensaio preliminar

Diluições %	Biomassa inicial	Biomassa final	Biom. produzida	% Inibição
3,1	2,20E+05	0,00E+00	-2,20E+05	100
1,6	2,20E+05	0,00E+00	-2,20E+05	100
0,8	2,20E+05	5,00E+04	-1,70E+05	100
0,4	2,20E+05	2,00E+05	-2,00E+04	100,0
0,2	2,20E+05	1,00E+05	-1,20E+05	100,0
Controle	2,20E+05	4,00E+06	3,78E+06	0,0

Efluente deslignificação

Diluições %	Biomassa inicial	Biomassa final	Biom. produzida	Desv. Pad	Média da biomassa	% Inibição	D.P. % Inib.	Média % Inib.
6,2	2,70E+05	1,00E+05	-1,70E+05	2,47E+05	-5,33E+04	103,6	5,3	101,1
6,2	2,70E+05	5,00E+04	-2,20E+05			104,7		
6,2	2,70E+05	5,00E+05	2,30E+05			95,1		
3,1	2,70E+05	5,00E+04	-2,20E+05	6,34E+04	-1,93E+05	104,7	1,3	104,1
3,1	2,70E+05	3,25E+04	-2,38E+05			105,1		
3,1	2,70E+05	1,50E+05	-1,20E+05			102,6		
1,6	2,70E+05	1,50E+05	-1,20E+05	5,20E+04	-1,62E+05	102,6	1,1	103,4
1,6	2,70E+05	5,00E+04	-2,20E+05			104,7		
1,6	2,70E+05	1,25E+05	-1,45E+05			103,1		
0,8	2,70E+05	9,50E+05	6,80E+05	1,80E+05	8,80E+05	85,5	3,8	81,3
0,8	2,70E+05	1,30E+06	1,03E+06			78,1		
0,8	2,70E+05	1,20E+06	9,30E+05			80,2		
0,4	2,70E+05	1,25E+06	9,80E+05	6,61E+05	1,48E+06	79,1	14,1	68,5
0,4	2,70E+05	1,50E+06	1,23E+06			73,8		
0,4	2,70E+05	2,50E+06	2,23E+06			52,5		
0,2	2,70E+05	3,40E+06	3,13E+06	2,00E+05	3,33E+06	33,4	4,3	29,1
0,2	2,70E+05	3,60E+06	3,33E+06			29,1		
0,2	2,70E+05	3,80E+06	3,53E+06			24,8		
0,1	esperado							
Controle 1	2,70E+05	4,90E+06	4,63E+06	1,40E+06	4,70E+06	1,4	19,6	0,0
Controle2	2,70E+05	3,60E+06	3,33E+06			29,1		
Controle 3	2,70E+05	6,40E+06	6,13E+06			-30,5		

Efluente nitração

Diluições %	Biomassa inicial	Biomassa final	Biom. produzida	Desv. Pad	Média da biom. prod.	% Inibição	D.P. % Inib.	Média % Inib.
100	1,25E+05	2,00E+05	7,50E+04	28867,51	5,83E+04	98,0	0,8	98,5
100	1,25E+05	2,00E+05	7,50E+04			98,0		
100	1,25E+05	1,50E+05	2,50E+04			99,3		
73	1,25E+05	2,60E+06	2,48E+06	202072,59	2,36E+06	34,9	5,3	37,9
73	1,25E+05	2,25E+06	2,13E+06			44,1		
73	1,25E+05	2,60E+06	2,48E+06			34,9		
50	1,25E+05	4,15E+06	4,03E+06	602771,38	3,46E+06	-5,9	15,9	9,0
50	1,25E+05	3,65E+06	3,53E+06			7,2		
50	1,25E+05	2,95E+06	2,83E+06			25,7		
37	1,25E+05	3,40E+06	3,28E+06	565685,42	2,45E+06	13,8	14,9	3,3
37	1,25E+05	4,20E+06	4,08E+06			-7,2		
25	1,25E+05	4,70E+06	4,58E+06	450924,98	4,14E+06	-20,4	11,9	-9,0
25	1,25E+05	3,80E+06	3,68E+06			3,29		
25	1,25E+05	4,30E+06	4,18E+06			-9,87		
Controle 1	1,25E+05	3,20E+06	3,08E+06	1155782,56	3,79E+06	19,08	30,4	0,2
Controle2	1,25E+05	5,25E+06	5,13E+06			-34,87		
Controle 3	1,25E+05	3,30E+06	3,18E+06			16,45		

Efluente mistura

Diluições %	Biomassa inicial	Biomassa final	Biom. produzida	Desv. Pad	Média da biomassa	% Inibição	D.P. % Inib.	Média % Inib.
6,2	8,50E+04	5,70E+05	4,85E+05	1,91E+05	2,72E+05	87,24	5,04	92,85
6,2	8,50E+04	3,00E+05	2,15E+05			94,34		
6,2	8,50E+04	2,00E+05	1,15E+05			96,97		
3,1	8,50E+04	5,50E+05	4,65E+05	1,73E+05	7,65E+05	87,76	4,56	79,87
3,1	8,50E+04	8,50E+05	7,65E+05			79,87		
3,1	8,50E+04	8,50E+05	7,65E+05			79,87		
1,6	8,50E+04	6,00E+05	5,15E+05	2,64E+06	2,92E+06	86,45	9,30	79,00
1,6	8,50E+04	1,10E+06	1,02E+06			73,29		
1,6	8,50E+04	5,40E+06	5,32E+06			-39,87		
0,8	8,50E+04	2,10E+06	2,02E+06	2,52E+05	1,98E+06	46,97	6,62	47,85
0,8	8,50E+04	1,80E+06	1,72E+06			54,87		
0,8	8,50E+04	2,30E+06	2,22E+06			41,71		
0,4	8,50E+04	3,05E+06	2,97E+06	1,10E+06	2,64E+06	21,97	29,02	46,54
0,4	8,50E+04	9,00E+05	8,15E+05			78,55		
0,4	8,50E+04	2,40E+06	2,32E+06			39,08		
0,2	8,50E+04	1,80E+06	1,72E+06	2,89E+05	2,22E+06	54,87	7,60	50,48
0,2	8,50E+04	2,30E+06	2,22E+06			41,71		-20,48
0,2	8,50E+04	1,80E+06	1,72E+06			54,87		
Controle2	8,50E+04	3,80E+06	3,72E+06	7,07E+04	3,77E+06	0,00	0,00	0,00
Controle 3	8,50E+04	3,90E+06	3,82E+06			0,00		