

DANIEL VON RONDON MARTINS

**AVALIAÇÃO ECOTOXICÓLOGICA DE EFLUENTES DE
CELULOSE BRANQUEADA DE EUCALIPTO AO LONGO DO
TRATAMENTO BIOLÓGICO**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa como
parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Engenharia Civil para a
obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA – MINAS GERAIS

BRASIL

2008

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

M386a
2008

Martins, Daniel Von Rondon, 1982-
Avaliação ecotoxicológica de efluentes de celulose
branqueada de eucalipto ao longo do tratamento biológico /
Daniel Von Rondon Martins. – Viçosa, MG, 2008.
xii, 71f.: il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui anexo.

Orientador: Ann Honor Munteer.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 52-58.

1. Águas residuais - Purificação - Tratamento biológico.
 2. Toxicologia ambiental. 3. Celulose - Branqueamento.
 4. Indústria de celulose - Eliminação de resíduos. 5. Celulose - Biodegradação. I. Universidade Federal de Viçosa.
- II. Título.

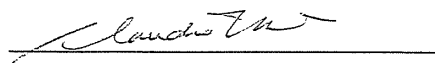
CDD 22.ed. 628.35

DANIEL VON RONDON MARTINS

**AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DE EFLUENTES DE
CELULOSE BRANQUEADA DE EUCALIPTO AO LONGO
DO TRATAMENTO BIOLÓGICO**

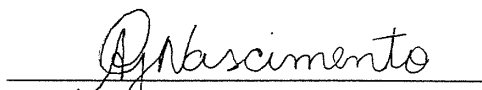
Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Viçosa como parte das exigências
do Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Civil para a obtenção do título de
Magister Scientiae.

APROVADA: 27 de outubro de 2008.

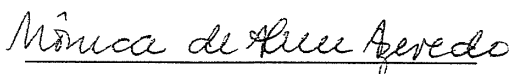


Prof. Cláudio Mudado Silva

(Co-Orientador)



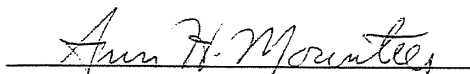
Prof. Antonio Galvão do Nascimento



Profª. Mônica de Abreu Azevedo



Profª. Teresa Cristina Brazil de Paiva



Profª. Ann Honor Munteer

(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu guia e protetor, que esteve sempre ao meu lado durante todo este tempo me auxiliando e me fortalecendo para vencer cada etapa.

À minha orientadora Dr. Ann Honor Mounteer, por todo o ensinamento transmitido, orientação constante e de grande valia, amizade e incentivo em todo o desenvolvimento deste trabalho;

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil da Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade e contribuição à formação científica e pessoal;

À CAPES pela bolsa concedida;

À Suzano Papel e Celulose, pela concessão das amostras e incentivo à pesquisa;

Ao laboratório de Controle da Qualidade da Água, da Divisão de Água e Esgoto da UFV, pela estrutura e equipamentos cedidos para viabilizar a realização deste trabalho de pesquisa;

Ao laboratório de Ecotoxicidade da Faculdade de Engenharia da USP de Lorena – SP, pelo treinamento concedido, sem o qual não seria possível a realização deste trabalho;

Ao Laboratório de Celulose e Papel da UFV, por conceder as análises de Microtox;

Aos Professores Cláudio Mudado, Teresa Cristina, Galvão e Mônica pelos conselhos e sugestões e por aceitarem o convite para participar da banca de defesa;

À doutoranda Juliana Sundfeld pela grande colaboração no período de treinamento feito na USP;

Aos colegas de trabalho Paula, Natália, Júlio, Josilene, Davi, Lorena pela imensa colaboração e trabalho realizado, e a todos os funcionários e estagiários da ETA que de alguma forma contribuíram;

A meus pais Antonio e Rosemari, e meus irmãos Luiza e Mateus, pelo amor e apoio incondicional e constante;

À Aline Castro Pereira pelo companheirismo e amor os quais são fundamentais;

Ao Jorge, Rejane, Ariane, Alisson e Alan, uma família muito especial que me ajudou muito nos últimos meses;

Aos meus amigos e irmãos em Cristo, pelas orações e convivência;

E a tantos outros que de alguma forma contribuíram na construção deste trabalho.

“Sei estar abatido, e sei também ter abundância: em toda maneira,
e em todas as coisas estou instruído, tanto a ter fartura,
como a ter fome, tanto a ter abundância como a padecer necessidade.

Posso todas as coisas naquele que me fortalece.”

Filipenses 4:12-13

BIOGRAFIA

DANIEL VON RONDON MARTINS, filho de Antonio Eustaquio Martins e Rosemari Von Rondon Martins, nasceu em Belo Horizonte, Minas Gerais no dia 28 de fevereiro de 1982.

Cursou o ensino fundamental no Colégio Santa Rita de Cássia, em Belo Horizonte-MG e o ensino médio no Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, CEFET-MG, onde também conclui o curso técnico de Eletromecânica em 2000.

Em 2001 ingressou no curso de Engenharia Ambiental na Universidade Federal de Viçosa-MG, concluindo o curso em maio de 2006. Neste mesmo mês ingressou no curso de Pós-Graduação em Engenharia Civil, área de concentração Saneamento Ambiental, da Universidade Federal de Viçosa-MG, concluindo os requisitos necessários à obtenção do título de “Magister Scientiae” em outubro de 2008.

Em 2008 foi professor da Universidade do Estado de Minas Gerais (UEMG), em João Monlevade-MG, onde lecionou disciplinas na área de saneamento para o curso de graduação em Engenharia Ambiental, no período de agosto a dezembro.

ÍNDICE

| | |
|--|------|
| LISTA DE FIGURAS | vii |
| LISTA DE TABELAS | viii |
| GLOSSÁRIO..... | ix |
| RESUMO | xi |
| ABSTRACT | xii |
| 1 - INTRODUÇÃO | 1 |
| 2 - OBJETIVOS | 4 |
| 3 - REVISÃO DE LITERATURA..... | 4 |
| 3.1 - Ecotoxicologia..... | 4 |
| 3.1.1 - Legislação pertinente..... | 5 |
| 3.1.2 - Ensaio ecotoxicológicos | 10 |
| 3.2 - Indústria de celulose..... | 16 |
| 3.2.1 - Processo de produção da celulose..... | 16 |
| 3.2.2 - Caracterização e tratamento de efluentes na indústria de celulose branqueada de eucalipto | 17 |
| 3.2.3 - Efeitos de efluentes de celulose nos ecossistemas aquáticos..... | 19 |
| 4 - MATERIAL E MÉTODOS | 23 |
| 4.1 - Caracterização do objeto de estudo..... | 23 |
| 4.2 - Análises físico-químicas | 28 |
| 4.3 - Ensaio ecotoxicológicos | 29 |
| 4.3.1 – Teste de viabilidade..... | 29 |
| 4.3.2 – Cultivo dos microcrustáceos..... | 30 |
| 4.3.3 – Testes de sensibilidade | 32 |
| 4.3.4 - Toxicidade aguda | 33 |
| 4.3.5 - Toxicidade crônica | 34 |
| 5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO | 37 |
| 5.1 – Análises físico-químicas..... | 37 |
| 5.1.1 – Água de cultivo..... | 37 |
| 5.1.2 – Amostras..... | 38 |
| 5.2 – Testes de toxicidade | 41 |
| 5.2.1 – Avaliação da água de cultivo..... | 41 |
| 5.2.2 - Testes de sensibilidade..... | 41 |

| | |
|---|----|
| 5.2.3 –Toxicidade das amostras de efluentes | 44 |
| 6 – CONCLUSÕES..... | 50 |
| 7 – SUGESTÕES PARA ESTUDOS FUTUROS..... | 51 |
| 8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 52 |
| ANEXO A – ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO EFLUENTE | 60 |
| ANEXO B – PREPARO DE SOLUÇÕES-TESTE E TESTES DE SENSIBILIDADE. | 61 |
| ANEXO C – DADOS EXPERIMENTAIS DOS TESTES DE TOXICIDADE..... | 65 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 – Laboratório de ecotoxicidade da UFV, criado em março de 2008. | 3 |
| Figura 2 - Relação concentração-resposta clássica | 15 |
| Figura 3 – Foto aérea do Rio Mucuri à jusante da Fábrica da Suzano..... | 24 |
| Figura 4 – Sistema de tratamento de efluente da fábrica da Suzano..... | 27 |
| Figura 5 – Esquema do sistema de tratamento de efluentes da Suzano Papel e Celulose – unidade Mucuri e pontos de coletas de amostra. | 28 |
| Figura 6 – Qualidade dos efluentes da entrada da lagoa aerada (P1) à saída da lagoa de polimento (P5) do sistema de tratamento da Suzano - Mucuri..... | 39 |
| Figura B1 – Carta controle contendo os resultados dos testes de sensibilidade de <i>Daphnia similis</i> à substância de referência NaCl. | 61 |
| Figura B2 – Carta controle contendo os resultados dos testes de sensibilidade de <i>Ceriodaphnia dubia</i> à substância de referência NaCl. | 62 |
| Figura B3 – Curva padrão para a alga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> (Relação Concentração x Absorbância 750 nm) | 62 |
| Figura B4 – Resultado do 1º teste de sensibilidade com <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> . Substância de referência: CuSO ₄ | 63 |
| Figura C1 – Porcentagem de efeito causado à bactéria <i>Vibrio fischeri</i> exposta ao efluente. Amostra: P1 | 65 |
| Figura C2 – Porcentagem de efeito causado à bactéria <i>Vibrio fischeri</i> exposta ao efluente. Amostra: P1' | 65 |
| Figura C3 - Teste de toxicidade crônica com a alga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> . Amostra avaliada: P1..... | 68 |
| Figura C4 - Teste de toxicidade crônica com a alga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> . Amostra avaliada: P1' | 68 |
| Figura C5 - Teste de toxicidade crônica com a alga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> . Amostra avaliada: P1'' | 69 |
| Figura C6 - Teste de toxicidade crônica com a alga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> . Amostra avaliada: P5..... | 69 |
| Figura C7 - Teste de toxicidade crônica com a alga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> . Amostra avaliada: P5' | 70 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 – Limites máximos de toxicidade para efluentes de diferentes origens | 7 |
| Tabela 2 – Dimensões das unidades de tratamento da ETE-Suzano - Mucuri..... | 26 |
| Tabela 3 – Pontos de coleta das amostras analisadas | 28 |
| Tabela 4 – Parâmetros físico-químicos de análise das amostras e suas respectivas metodologias analíticas e equipamentos utilizados | 29 |
| Tabela 5 – Substâncias de referência e suas respectivas faixas de concentração utilizadas para os testes de sensibilidade..... | 33 |
| Tabela 6 – Parâmetros físico-químicos do meio de cultivo dos microcrustáceos | 37 |
| Tabela 7 – Faixas toleráveis de variação dos parâmetros físico-químicos..... | 38 |
| Tabela 8 – Eficiência de remoção da matéria orgânica (DQO, DBO e cor) ao longo do sistema de tratamento de efluentes da Suzano-Mucuri | 39 |
| Tabela 9 – Resultados do teste de viabilidade da água de um poço artesiano (Bairro Acamari), utilizando <i>Daphnia similis</i> como organismo-teste | 41 |
| Tabela 10 – Resultado dos testes de sensibilidade com <i>Daphnia similis</i> | 42 |
| Tabela 11 – Resultado dos testes de sensibilidade com <i>Ceriodaphnia dubia</i> | 43 |
| Tabela 12 – CI25 e intervalo de confiança para os testes de sensibilidade com <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> à substância de referência CuSO ₄ | 43 |
| Tabela 13 – Resultados dos testes de toxicidade de amostras de efluente coletado ao longo do sistema de tratamento da Suzano-Mucuri, para os organismos-teste utilizados | 45 |
| Tabela A1 – Parâmetros físico-químicos analisados para o efluente da Suzano..... | 60 |
| Tabela A2 – Dados físico-químicos de entrada e saída do sistema de tratamento fornecidos pela empresa | 60 |
| Tabela B1 – Volume de solução-estoque para preparo das soluções-teste com águas e efluentes utilizando o meio L.C. Oligo e amostra enriquecida | 61 |
| Tabela C1 – Resultados experimentais dos testes de toxicidade com <i>Daphnia similis</i> | 66 |
| Tabela C2 – Resultados experimentais para o teste de toxicidade crônica com <i>Ceriodaphnia dubia</i> (com os dados de reprodução e sobrevivência)..... | 67 |
| Tabela C3 – Teste Dunnet para o efeito crônico na reprodução de <i>Ceriodaphnia dubia</i> | 67 |
| Tabela C4 – Teste Dunnet para o efeito crônico no crescimento da alga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> | 71 |

GLOSSÁRIO

- **AGENTE TÓXICO** : Substâncias ou outros materiais, tais como formulações químicas, efluentes líquidos e águas contaminadas continentais, estuarinas ou oceânicas, que podem causar efeitos deletérios quando em contato com os organismos-teste.
- **ÁGUA DE DILUIÇÃO** : Água natural ou artificial, de boa qualidade, utilizada para manutenção de culturas e para realização dos testes de toxicidade.
- **CONCENTRAÇÃO EFETIVA (CE50;...h.)** : Concentração do agente tóxico que causa efeito agudo (ex. imobilidade ou morte) a 50% dos organismos-teste, num determinado período de exposição, nas condições de teste, por exemplo CE50; 48 horas.
- **CONCENTRAÇÃO LETAL (CL50;...h.)** : Concentração tóxica que provoca a morte dos organismos-teste. Usualmente definida como concentração média letal (CL50), ou seja, a concentração que mata 50% dos organismos expostos a um tempo específico nas condições de teste, por exemplo, CL50; 96 horas.
- **CONCENTRAÇÃO DE EFEITO NÃO OBSERVADO (CENO)** : É a maior concentração nominal do agente tóxico que não causa efeito deletério estatisticamente significativo na sobrevivência e reprodução dos organismos, nas condições de teste.
- **CONCENTRAÇÃO DE EFEITO OBSERVADO (CEO)** : É a menor concentração nominal do agente tóxico, que causa efeito deletério estatisticamente significativo na sobrevivência e reprodução dos organismos, nas condições de teste.
- **CONCENTRAÇÃO PERCENTUAL DE INIBIÇÃO (CIp)** : É a concentração que causa um percentual “p” de inibição na reprodução ou no desenvolvimento embrionário e/ou larval em um tempo específico de exposição, nas condições de teste.
- **CONCENTRAÇÃO DO EFLUENTE NO RIO (C.E.R.)** : Quando lançado em um corpo hídrico, os efluentes sofrem um gradativo processo de diluição, em função da sua vazão e do volume do corpo receptor, resultando numa concentração final do efluente. Esta concentração pode ser calculada pela fórmula:

$$CER = \frac{Vazão\ do\ efluente \times 100}{Vazão\ do\ efluente + Q_{7,10}}$$

- **SOLUÇÕES-ESTOQUE** : Soluções do agente tóxico em diferentes concentrações, a partir das quais são preparadas as soluções-teste.

- **SOLUÇÕES-TESTE** : Soluções finais do agente tóxico, nas quais são expostos os organismos-teste.
- **SUBSTÂNCIA DE REFERÊNCIA** : Substância química utilizada para avaliar a sensibilidade dos organismos-teste.
- **TEMPO DE EXPOSIÇÃO** : Período durante o qual um organismo é exposto a uma solução-teste.
- **TESTE DE TOXICIDADE** : Método utilizado para detectar e avaliar a capacidade inerente do agente tóxico em produzir efeitos deletérios nos organismos-teste.
- **TESTE ESTÁTICO** : Teste de toxicidade no qual os organismos são expostos à mesma solução-teste durante o período de ensaio. Aplicado em testes de curta duração.
- **TESTE SEMI-ESTÁTICO** : Teste de toxicidade no qual os organismos são expostos à uma solução-teste a qual é renovada (trocada) em intervalos de tempo pré-determinados, geralmente a cada 48 horas. Aplicado em testes de longa duração (testes crônicos).
- **TOXICIDADE** : Capacidade inerente do agente tóxico em produzir efeitos deletérios aos organismos vivos.
- **TOXICIDADE AGUDA** : Efeito observado de curta duração, que se manifesta rápida e severamente, causando a letalidade ou alguma outra manifestação do organismo, num intervalo de 0 a 96 horas.
- **TOXICIDADE CRÔNICA** : Efeito de longa duração relatado como mudança no metabolismo, crescimento, reprodução, mutações e até mesmo morte dos organismos-teste.
- **VAZÃO MÍNIMA DO RIO ($Q_{7,10}$)** : Vazão mínima do rio, média de 7 dias consecutivos, com probabilidade de retorno de 10 anos. Obs.: Quando os dados de históricos de vazão não são conhecidos, adota-se a pluviosidade na bacia hidrográfica para determinar a $Q_{7,10}$.
- **VALOR CRÔNICO (VC)** : É a média geométrica dos valores de CENO e CEO.

RESUMO

MARTINS, Daniel Von Rondon, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Outubro de 2008. **Avaliação Ecotoxicológica de Efluentes de Celulose Branqueada de Eucalipto ao Longo do Tratamento Biológico.** Orientadora: Ann Honor Mounteer. Co-orientadores: Rafael Kopschitz Xavier Bastos e Cláudio Mudado Silva.

O presente estudo teve como objetivo avaliar a toxicidade de efluentes de celulose branqueada de eucalipto. Inicialmente foi feita uma caracterização físico-química das amostras, em diferentes pontos ao longo do tratamento, e posteriormente para estes mesmos pontos foi avaliada a toxicidade com quatro organismos-teste: para toxicidade aguda: a) *Vibrio fischeri* (sistema Microtox®) e b) *Daphnia similis*; para toxicidade crônica: c) *Ceriodaphnia dubia* e d) *Pseudokirchneriella subcapitata*. Para a realização dos testes foi criado o laboratório de Ecotoxicidade da UFV, localizado atualmente na Divisão de Água e Esgoto da referida Universidade, onde foram padronizadas as condições para a execução dos testes com os organismos-teste citados anteriormente (letras b, c e d). Os resultados encontrados apontam para a ausência de toxicidade aguda para o efluente estudado. No que diz respeito à toxicidade crônica apenas para *Ceriodaphnia dubia* encontrou-se toxicidade quando se testou concentrações elevadas do efluente. O efluente tratado apresentou uma CE₅₀ de 73,5% para o referido microcrustáceo e foram ainda observados efeitos na reprodução destes organismos expressos por um valor crônico (VC) de 71%. Entretanto, quando se considerou a diluição do efluente no corpo receptor calculada com base na resolução SMA-3/2000 da Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo, o efeito tóxico crônico para *Ceriodaphnia dubia* desaparece. Para a alga *Pseudokirchneriella subcapitata* os resultados mostraram um estímulo ao crescimento desta alga na presença do efluente, o que gera uma outra preocupação relativa à eutrofização do corpo hídrico estudado.

ABSTRACT

MARTINS, Daniel Von Rondon, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, October of 2008. **Ecotoxicology assessment of bleached eucalipt pulp mill effluents in the biological treatment.** Adviser: Ann Honor Munteer. Co-advisers: Rafael Kopschitz Xavier Bastos and Cláudio Mudado Silva.

In this work the toxicity of bleached eucalypt pulp mill effluents was assessed. First, a physical-chemical characterization of the samples was done at different points along the treatment. Then the samples were submitted to toxicity tests with four monitor organisms. For the acute toxicity assessment *Vibrio fischeri* (Microtox® system) and *Daphnia similis* were used, while the chronic toxicity test was performed with *Ceriodaphnia dubia* and *Pseudokirchneriella subcapitata*. The experiments were done on the Eco-toxicity Laboratory, created on the Water and Waste Division located on the UFV campus. Cultivation conditions were standardized and tests were developed for the organisms *Daphnia similis*, *Ceriodaphnia dubia*, and *Pseudokirchneriella subcapitata*. The results indicate that there is no acute toxicity in the effluent. On the other hand, chronic toxicity was detected when higher concentrations of the effluent were used in the assay with *Ceriodaphnia dubia*. The treated effluent presents a $EC_{50} = 73,5\%$ to the above crustacean and a negative reproductive effect was observed with a chronic value (CV) of 71%. However, when the dilution factor, which is calculated according to the resolution SMA-3/2000 of “Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo”, was considered on the water body, the chronic effect to *Ceriodaphnia dubia* was not significant. Finally, the treated effluent stimulated the growth of the green algae *Pseudokirchneriella subcapitata* raising the concern of water body eutrofization.

1 - INTRODUÇÃO

Os lançamentos acidentais ou deliberados de compostos químicos tóxicos no ambiente têm o potencial de desregular a estrutura e o funcionamento dos ecossistemas. Com a Revolução Industrial e o desenvolvimento tecnológico acelerado, os processos produtivos, em geral, têm contado com inúmeros compostos químicos naturais e/ou sintéticos os quais, quando adicionados, aceleram a produção. Porém, ao final do processo geram-se resíduos os quais abrigam um elevado potencial tóxico e poluidor.

No passado o principal problema relativo ao lançamento de efluentes era a desoxigenação dos corpos d'água receptores, e, para tanto, tais corpos d'água eram principalmente monitorados e regulados com base em sua concentração de matéria orgânica. Hoje, devido aos avanços científicos e tecnológicos em sistemas de tratamento de efluentes as cargas orgânicas dos efluentes tratados têm decrescido, e, portanto, outros tipos de impactos vêm sendo focados e estudados, especialmente os impactos toxicológicos.

Os compostos organoclorados presentes em efluentes de fábricas de celulose brasileiras, as quais, em sua grande maioria, utilizam dióxido de cloro nos processos de branqueamento, tem se tornado um motivo de preocupação devido à sua recalcitrância à degradação biológica, além da toxicidade destes compostos para as espécies aquáticas.

Outro motivo de preocupação, relativo aos efluentes de celulose, são os extrativos da madeira. Tais compostos estão presentes nestes efluentes em concentrações as quais acarretam efeitos tóxicos, e, alguns se incluem no grupo dos estrogênios ambientais. Os estrogênios ambientais pertencem ao grupo dos compostos disruptores endócrinos. Uma das maiores evidências que ilustram a ação dos disruptores endócrinos são os efeitos reprodutivos em organismos, reportados na literatura em várias espécies de peixes expostos a efluentes domésticos e efluentes de fábricas de celulose.

Estudos envolvendo ensaios ecotoxicológicos e efluentes de indústria de celulose são bastante escassos e pouco conclusivos no Brasil. Cabe ressaltar que a norma brasileira (Resolução CONAMA 357/2005) requer, para o lançamento dos efluentes em um determinado corpo d'água, uma avaliação ecotoxicológica deste efluente no que diz respeito aos possíveis efeitos tóxicos agudos e/ou crônicos à comunidade aquática. Para tanto, estudos como este devem ser desenvolvidos com o

intuito de fornecer aos empreendedores, órgãos de fiscalização, prefeituras e demais interessados, os subsídios necessários ao enquadramento dos efluentes à norma vigente.

O presente estudo culminou na montagem do Laboratório de Ecotoxicidade da Universidade Federal de Viçosa que teve como objetivo inicial subsidiar esta pesquisa e estabelecer as condições de cultivo para alguns organismos-teste.

Para tanto, inicialmente foi feito um treinamento na Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, na cidade de Lorena-SP, com o objetivo de aprimorar os conceitos teóricos e práticos relativos ao cultivo dos organismos e a realização de testes de toxicidade. Após o período de treinamento uma equipe foi montada com o objetivo de reproduzir as condições encontradas no laboratório de ecotoxicidade da USP de Lorena.

O laboratório de Controle e Qualidade da Água da Divisão de Água e Esgoto da Universidade Federal de Viçosa disponibilizou uma pequena sala para que se fosse construído o laboratório de ecotoxicidade. A escolha de um espaço menor seria interessante para facilitar a manutenção da temperatura de toda a sala em 23°C, imprescindível para o cultivo dos organismos. Foram instaladas também as prateleiras para dispor vidrarias, bandejas de testes, reagentes, potes de cultura em massa, etc.

Posteriormente instalou-se toda a parte elétrica da sala para se obter a iluminação necessária para o cultivo e os testes de toxicidade. Para os microcrustáceos *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia dubia* foi promovido um fotoperíodo de 12 horas, e para a alga *Pseudokirchneriella subcapitata* 24 horas ininterruptas de iluminação.

Além das culturas em massa dos microcrustáceos era mantida, na sala de ecotoxicidade, uma cultura em meio líquido da alga mencionada que serviria para a preparação do alimento dos microcrustáceos. Eram mantidas também em geladeira culturas em meio sólido desta alga de forma a manter um estoque da alga para testes e para a renovação das culturas líquidas, que foi feita todas as semanas.

A preparação dos testes era feita toda dentro da sala de ecotoxicidade de forma a evitar contaminações e variações de temperatura. Para os testes com alga foram usadas mesas agitadoras (com rotação regulável) com o intuito de manter as condições de teste que requerem uma agitação constante de aproximadamente 100 rpm.

A Figura 1 mostra o laboratório montado, depois de um trabalho de aproximadamente quatro meses, período no qual foram feitas todas as compras de equipamentos, vidrarias e instalações necessárias. Após este período adquiriu-se um novo lote de organismos-teste junto à CETESB (dos organismos *Daphnia similis*,

Ceriodaphnia dubia e *Pseudokirchneriella subcapitata*) iniciando-se um período de estabilização das culturas para que posteriormente fossem realizados os testes de toxicidade. Neste mesmo intervalo de tempo foi requisitado junto à Suzano o envio das amostras para que fossem iniciados os testes de toxicidade.

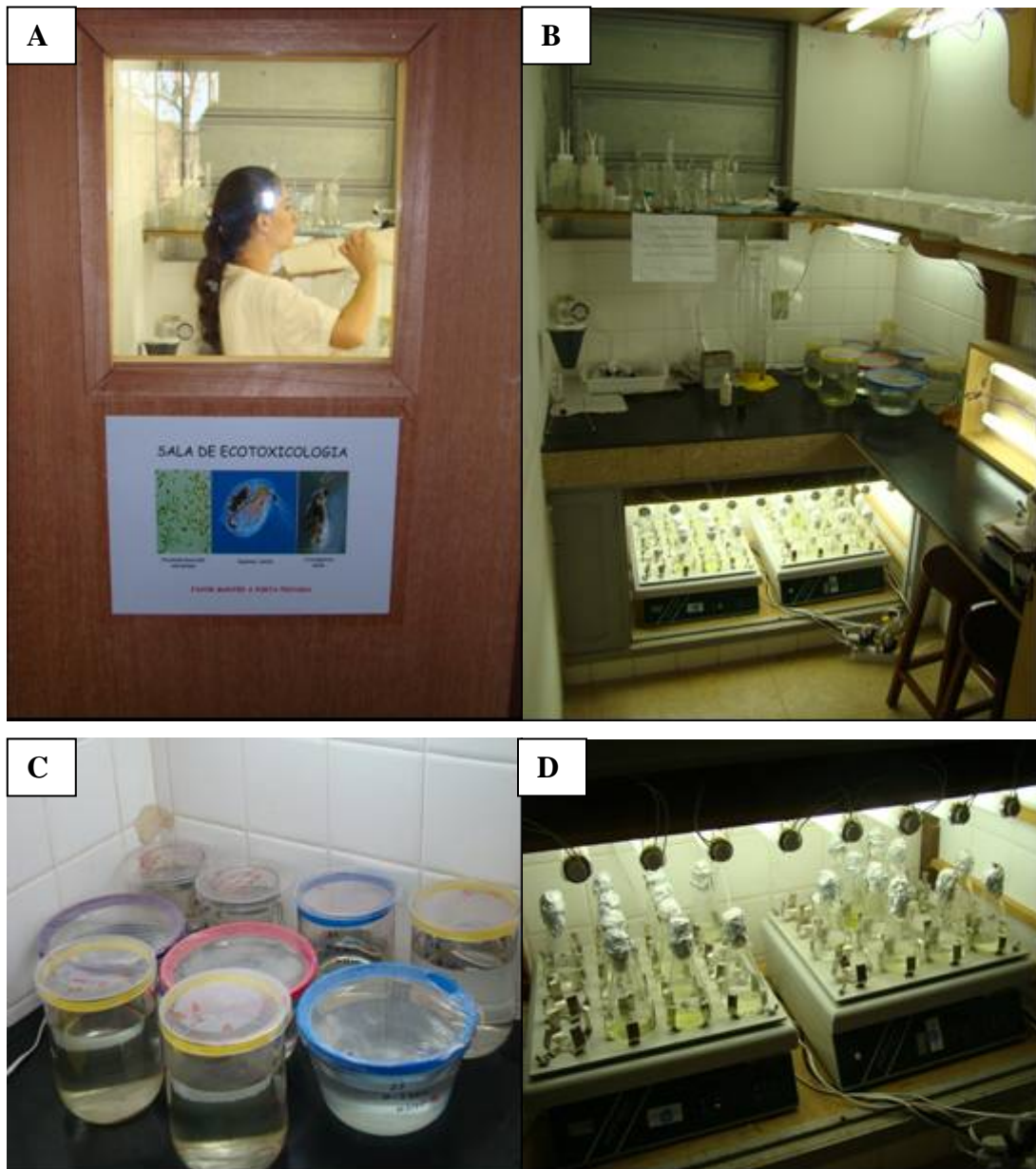


Figura 1 – Laboratório de ecotoxicidade da UFV, criado em março de 2008. A: Entrada do laboratório; B: Laboratório de ecotoxicidade; C: Potes de cultura em massa de *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia dubia*; D: Mesas agitadoras para testes com *Pseudokirchneriella subcapitata*.

2 - OBJETIVOS

O objetivo do presente estudo foi avaliar a toxicidade dos efluentes de uma fábrica de celulose kraft branqueada de eucalipto e o impacto do tratamento biológico aeróbio sobre a remoção da matéria orgânica. Os objetivos específicos do projeto são:

- avaliar a eficiência de remoção da matéria orgânica ao longo do sistema de tratamento;
- avaliar a toxicidade aguda e crônica do efluente bruto;
- fazer um diagnóstico da redução/eliminação da toxicidade ao longo do sistema de tratamento.

3 - REVISÃO DE LITERATURA

3.1 - Ecotoxicologia

O termo Ecotoxicologia foi sugerido pela primeira vez em junho de 1969, durante uma reunião do *Committee of the International Council of Scientific Unions* (ICSU), em Estocolmo, pelo toxicologista francês René Truhaut. Após esse evento foi formado um comitê científico do ICSU sobre problemas ambientais (SCOPE), o qual seria encarregado de organizar um grupo de trabalho sobre essa nova ciência, a Ecotoxicologia (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2006). Este comitê chegou a uma definição para o termo: “*ciência que estuda os efeitos das substâncias naturais ou sintéticas sobre os organismos vivos, populações e comunidades, animais ou vegetais, terrestres ou aquáticos, que constituem a biosfera, incluindo assim a interação das substâncias com o meio nos quais os organismos vivem num contexto integrado*” (PLAA, 1982; CAIRNS e NIEDERLEHNER, 1995, *apud* ZAGATTO e BERTOLETTI, 2006).

Na prática os termos *Ecotoxicologia* e *Toxicologia Ambiental* são utilizados indistintamente, até como sinônimos. Há uma tendência em utilizar a expressão *Toxicologia Ambiental* somente para os estudos dos efeitos diretos das substâncias químicas ou xenobióticos ambientais sobre os ecossistemas e seus componentes não humanos, entretanto, tal distinção é bastante superficial. Os seres humanos não estão isolados de seu ambiente natural; eles estão no topo de muitas cadeias alimentares e há

poucos ecossistemas nos quais a espécie humana não está envolvida (AZEVEDO e CHASIN, 2003).

A primeira iniciativa em termos metodológicos na área de Ecotoxicologia, no Brasil, se deu em 1975, num programa internacional de padronização de testes de toxicidade aguda com peixes, desenvolvido pelo Comitê Técnico de Qualidade das Águas TC147 da *International Organization for Standardization* (ISO). Em janeiro de 2000, o comitê formado no 5º ECOTOX fundou a Sociedade Brasileira de Ecotoxicologia – SETAC Brasil (*Society of Environmental Toxicology and Chemistry*) (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2006).

Nos dias de hoje, aproximadamente 120 mil substâncias químicas estão em uso comum e cerca de 11 mil são produzidas em quantidades superiores a 599 kg/ano. Do total de compostos presentes no ambiente, só um em cada mil é de origem antropogênica, mas isso inclui alguns compostos tóxicos e muitos outros persistentes que se acumulam nos organismos vivos em níveis perigosos (PAASIVIRTA, 1991 *apud* AZEVEDO e CHASIN, 2003).

3.1.1 - Legislação pertinente

Para o controle da qualidade da água e do aporte destas substâncias aos corpos d'água através do despejo de efluentes domésticos e industriais, está em vigência a norma brasileira Resolução CONAMA 357/2005, que dispõe sobre a classificação dos corpos de água e as diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes. Em seu artigo 8º, parágrafos 3º e 4º, a norma estabelece que a qualidade dos ambientes aquáticos possa ser avaliada por indicadores biológicos, quando apropriado, utilizando-se organismos e/ou comunidades aquáticas. Ademais, as possíveis interações entre as substâncias e a presença de contaminantes não listados nesta Resolução, passíveis de causar danos aos seres vivos, deverão ser investigadas utilizando-se ensaios ecotoxicológicos, toxicológicos, ou outros métodos cientificamente reconhecidos.

Ainda nesta Resolução, no que diz respeito ao enquadramento dos corpos d'água em classes, os artigos 14 e 15 estabelecem que as águas doces de classe 1 e 2 devem observar a seguinte condição e padrão: “não verificação de efeito tóxico crônico a organismos, de acordo com os critérios estabelecidos pelo órgão ambiental competente, ou, na sua ausência, por instituições nacionais ou internacionais renomadas, comprovado pela realização de ensaio ecotoxicológico padronizado ou outro método

cientificamente reconhecido”. Para as classes 3 e 4 a Resolução estabelece que não haja a verificação do efeito tóxico agudo (menos restritivo).

Quanto ao lançamento de efluentes, o artigo 34 da referida norma em seus parágrafos 1º e 2º diz que: “O efluente não deverá causar ou possuir potencial para causar efeitos tóxicos aos organismos aquáticos no corpo receptor, de acordo com os critérios de toxicidade estabelecidos pelo órgão ambiental competente. Estes critérios de toxicidade devem se basear em resultados de ensaios ecotoxicológicos padronizados, utilizando organismos aquáticos, e realizados no efluente”.

A Lei Federal de Recursos Hídricos 9433/1997, descreve em seu Art. 22 que: “Será considerado na cobrança pelo lançamento de esgotos e demais resíduos em corpos hídricos: o volume lançado e seu regime de variação e as características físico químicas, biológicas e de toxicidade” (BRASIL, 1997).

Vários estados estabelecem critérios e padrões de toxicidade para lançamento de efluentes, citados como segue:

A Portaria Estadual 017/02 da Fundação do Meio Ambiente de Santa Catarina FATMA, (2002) dispõe sobre a toxicidade como parâmetro de caracterização dos efluentes de diferentes origens impondo limites de lançamento para o estado de Santa Catarina. Em seu Art. 1º diz que “As substâncias presentes nos efluentes não poderão causar ou possuir potencial causador de efeitos tóxicos, alterações no comportamento e fisiologia dos organismos aquáticos no corpo receptor”, o que salienta a importância da análise da toxicidade.

Já o Art. 2º descreve que “A toxicidade do efluente, bem como do corpo receptor, será determinada em laboratório por testes ecotoxicológicos padronizados, cujos resultados são expressos em FD (Fator de Diluição)”, determinando o procedimento de análise. Cabe lembrar que a definição de FD, estabelecido em um parágrafo único por esta Portaria, e de FT (Fator de Toxicidade) conforme a ABNT (2004e), corresponde à primeira de uma série de diluições que não cause efeito tóxico agudo aos organismos teste.

Com os resultados de toxicidade, pode-se avaliar o efeito tóxico que efluentes causariam ao corpo receptor caso o atingissem. Segundo a FATMA (2002), Portaria nº 017/02, a percentagem do efluente no corpo receptor (PER), a qual corresponde a concentração do efluente no corpo receptor (CER), deverá ser menor ou igual ao fator de toxicidade (FT) expressa em percentagem dividido por 2, para que não cause efeito agudo, evitando assim impacto ao meio aquático.

O Art. 5º, também desta Portaria, estabelece os limites máximos de toxicidade para efluentes de diversas tipologias industriais, utilizando *Daphnia magna* e *Vibrio fischeri* como organismos bioindicadores de toxicidade. Estes limites são representados pelo fator de diluição (FD) conforme mostra a Tabela 1.

Tabela 1 – Limites máximos de toxicidade para efluentes de diferentes origens

| Categoria do efluente | Subcategoria | Limite de toxicidade aguda para <i>Daphnia magna</i> | | Limite de toxicidade aguda para <i>Vibrio fischeri</i> | |
|--------------------------------------|---|--|---------|--|----------|
| | | FDd | FDd (%) | FDbl | FDbl (%) |
| Metalmeccânica | Siderurgia | 4 | 25 | 6 | 16,66 |
| | Metalurgia | 4 | 25 | 6 | 16,66 |
| | Galvanoplastia | 16 | 6,25 | 8 | 12,5 |
| Alimentícia | Frigoríficos, abatedouros, laticínios, etc | 2 | 50 | 4 | 25 |
| Esgotos domésticos e/ou hospitalares | | 1 | 100 | 4 | 25 |
| Resíduos urbanos | Efluentes de aterros sanitários | 8 | 12,5 | 16 | 6,25 |
| Papel e celulose | | 2 | 50 | 4 | 25 |
| Couros, peles e produtos similares | | 4 | 25 | 6 | 16,66 |
| Têxtil | Beneficiamento de fibras naturais e sintéticas, confecção e tinturaria | 2 | 50 | 2 | 50 |
| Química | Agroquímica, Petroquímica, Produtos químicos não especificados ou não classificados | 2 | 50 | 4 | 25 |
| Farmacêutica | | 2 | 50 | 4 | 25 |

Fonte: Portaria 17/02 da FATMA

Nota: FDd: Fator de diluição para *Daphnia magna*

FDbl: Fator de diluição para *Vibrio Fischeri*

FDd(%) e FDbl(%): porcentagem de amostra na solução teste

O IAP – Instituto Ambiental do Paraná possui uma proposta de Resolução, a qual irá regulamentar os limites de toxicidade para o lançamento de efluentes. Em suas

considerações iniciais serão citadas que “As substâncias presentes nos efluentes não poderão causar ou possuir potencial para causar efeitos tóxicos, alterações no comportamento e fisiologia dos organismos aquáticos no corpo receptor, determinado em laboratório por testes ecotoxicológicos padronizados”.

A Resolução da Secretaria do Meio Ambiente de São Paulo - SMA-3, publicada no Diário Oficial do Estado em 25/02/2000 estabelece:

Art. 1º - Além de atenderem ao disposto na Lei 997/76, que institui o Sistema de Prevenção e Controle de Poluição do Meio Ambiente, com regulamentação aprovada pelo Decreto 8468/76 (Art. 18) e, considerando eventuais interações entre as substâncias no efluente, este não deverá causar ou possuir potencial para causar efeitos tóxicos aos organismos aquáticos no corpo receptor.

Para esta Resolução, as relações que determinam a toxicidade permissível são:

$$D.E.R \leq (CE_{50} \text{ ou } CL_{50})/100 \text{ ou } D.E.R \leq CENO/10,$$

onde: D.E.R = diluição do efluente no corpo receptor, em %;

CE_{50} = concentração do efluente que causa efeito agudo (imobilidade) a 50% dos organismos aquáticos, em um determinado período de tempo, em %;

CL_{50} = concentração do efluente que causa efeito agudo (letalidade) a 50% dos organismos aquáticos, em um determinado período de tempo, em %;

CENO = concentração do efluente que não causa efeito crônico observável, em %.

Ainda, nos parágrafos 1º e 2º desta Resolução se tem que:

§ 1º - “Os organismos utilizados nos testes de toxicidade, assim como os métodos de ensaio, serão definidos pela CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental) através de normas técnicas específicas”.

§ 2º - “Os limites de toxicidade são estabelecidos para cada efluente, podendo ser reavaliados pela CETESB, desde que a entidade responsável pela emissão apresente estudos sobre toxicidade do efluente a pelo menos três espécies de organismos aquáticos, variabilidade da toxicidade ao longo do tempo e, dispersão do efluente no corpo receptor” (SMA, 2000).

A FEPAM - Fundação Estadual de Proteção Ambiental do Estado do Rio Grande do Sul tem como diretriz a Lei Estadual 11520/00 que institui o Código Estadual do Meio Ambiente (BRASIL, 2000). O Art. 129 diz:

Art. 129 - Nenhum descarte de resíduo poderá conferir ao corpo receptor características capazes de causar efeitos letais ou alteração de comportamento, reprodução ou fisiologia da vida.

A FEEMA – Fundação Estadual de Engenharia e Meio Ambiente, no Estado do Rio de Janeiro, estabeleceu critérios e padrões de toxicidade para efluentes industriais através da Norma Técnica 213.R-4. Nesta, descreve-se que “não é permitido o lançamento de efluentes líquidos industriais no corpo receptor, com um número de unidades de toxicidade superior a 8 ($UT < 8$), obtido em testes de toxicidade aguda realizados com a espécie de peixes *Brachydanio rerio*, conforme a capacidade de diluição do rio nas condições especificadas” (PRONOL, 1990; NIEWEGLOWSKI e SILVA, 1999). A unidade de toxicidade pode ser definida pelas fórmulas:

$$UTa = 100 / CE_{50} \text{ ou } CL_{50},$$

$$UTc = 100 / CENO,$$

onde: UTa = Unidade tóxica aguda

UTc = Unidade tóxica crônica

Ainda, a NT 213.R – 4 da FEEMA dispõe em seus critérios específicos:

7.2 – “No caso de lançamento de efluentes líquidos industriais em reservatórios, lagos, baías, estuários, águas oceânicas, águas subterrâneas e de lançamentos em batelada, poderão ser estabelecidas exigências adicionais para cada caso específico”.

7.4 – “Poderão ser feitas exigências em relação às estruturas de lançamento de efluentes líquidos industriais, visando evitar, na zona de mistura, condições de toxicidade aguda ou que atuem como barreira à migração e a livre movimentação da biota aquática”.

Em Minas Gerais a Deliberação Normativa Conjunta do Conselho Estadual de Política Ambiental e do Conselho Estadual de Recursos Hídricos do Estado de Minas Gerais, (COPAM/CERH-MG, nº1/2008), dispõe sobre o enquadramento dos corpos d’água em classes e também estabelece as condições de lançamento de efluentes. Nesta Deliberação, publicada recentemente, foram incluídos alguns aspectos importantes relativos à avaliação ecotoxicológica. O Art. 7º, parágrafo 4º diz que: as possíveis interações entre as substâncias e a presença de contaminantes listados ou não nesta Deliberação Normativa, passíveis de causar danos aos seres vivos, deverão ser investigadas, utilizando-se ensaios ecotoxicológicos, toxicológicos, análises de bioacumulação e efeitos endócrinos ou outros métodos cientificamente reconhecidos. A

inclusão das análises de bioacumulação e dos efeitos endócrinos revela a importância destes tipos de análises, as quais não estão incluídas na norma federal publicada em ano anterior (CONAMA 357/2005).

Ainda no Art. 8º, parágrafo 2º ainda diz que: nos casos onde a metodologia analítica disponível for insuficiente para detectar as concentrações desses parâmetros de qualidade de água, os sedimentos e biota aquática poderão ser investigados respectivamente por meio de ensaio ecotoxicológico e análise de bioacumulação, quanto à presença eventual dessas substâncias.

Para corpos d'água classe 2, a deliberação dispõe, no Art.13º sobre condições de qualidade da água dentre as quais cabe destacar:

- não verificação de efeitos tóxicos decorrentes de florações algais, devendo, a partir de 10.000 cel/mL ou 1 mm³/L, realizar teste de toxicidade para verificar estes possíveis efeitos de acordo com os critérios estabelecidos pelo órgão estadual competente ou, na sua ausência, por instituições nacionais ou internacionais renomadas, comprovado pela realização de ensaio toxicológico padronizado;

- não verificação de efeito tóxico agudo e crônico a organismos em amostras de água e/ou sedimento, de acordo com os critérios a serem estabelecidos pelo COPAM;

- não verificação de bioacumulação de metais e compostos orgânicos na biota aquática, de acordo com os critérios a serem estabelecidos pelo COPAM e CERH-MG;

- não verificação de alterações no sistema endócrino de espécies da biota aquática, de acordo com os critérios a serem estabelecidos pelo COPAM e CERH-MG.

3.1.2 - Ensaio ecotoxicológicos

Este termo diz respeito à avaliação da toxicidade de agentes químicos, e que, no meio hídrico, é feita com a utilização de organismos representativos da coluna d'água ou dos sedimentos de ambientes de água doce, estuarina ou marinha.

Os testes de toxicidade devem ser considerados como uma análise indispensável no controle da poluição hídrica, pois detectam os efeitos dos poluentes sobre a biota, enquanto as análises químicas apenas identificam e quantificam as substâncias presentes nas amostras ambientais (HOFFMAN, 1995; ZAGATTO, 1999 *apud* FRACÁCIO, 2006)

Os ensaios ecotoxicológicos foram primeiramente realizados com peixes, e os primeiros relatos de uso de tais ensaios datam de 1920. Durante as décadas de 1940 e 1950 aumentaram os trabalhos nesta área, surgiram diferentes métodos de ensaios e os

pesquisadores perceberam que diferenças nas condições-teste acarretam diferentes resultados, demonstrando a necessidade de padronização dos testes (SLOOF, 1988 *apud* ZAGATTO e BERTOLETTI, 2006).

Atualmente, vários ensaios de toxicidade já estão bem estabelecidos, sendo alguns padronizados nacional e internacionalmente por associações ou organizações de normalização, como a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB), *Association Française de Normalisation* (AFNOR), *American Society for Testing and Materials* (ASTM), *American Water Works Association* (AWWA), *Deutsches Institut für Normung* (DIN), *International Organization for Standardization* (ISO) e *Organization for Economic Co-Operation and Development* (OECD) (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2006).

Segundo METCALF e EDDY (2003) *apud* GRADVOHL (2006), estes testes podem ser utilizados para vários tipos de avaliação e abordagem, tais como:

- Avaliar a sustentabilidade das condições ambientais para a vida aquática;
- Estabelecer concentrações aceitáveis de substâncias a serem recebidas conforme parâmetros convencionais (como OD, pH, temperatura, salinidade ou turbidez);
- Avaliar a toxicidade do efluente para um ou mais organismos-teste de águas doces, de estuários ou marinhos;
- Estabelecer sensibilidade relativa de um grupo de organismos aquáticos com relação a efluentes bem como a padrões tóxicos;
- Avaliar o grau de tratamento necessário para atender aos requisitos de controle de poluição da água;
- Determinar a eficiência dos sistemas de tratamento de efluentes;
- Estabelecer taxas permissíveis de descargas de efluentes.

Existem os testes de toxicidade agudos, definidos como uma forma de avaliar os efeitos sofridos pelos organismos após um curto período de exposição, e os testes de toxicidade crônicos, que se caracterizam pela longa duração e proporcionam a avaliação dos efeitos não letais do agente como alterações no crescimento, na reprodução e de efeitos subletais, os quais incluem mudança no comportamento (dificuldade de movimentação; aumento na frequência de abertura do opérculo), alterações fisiológicas,

bioquímicas e histológicas. Há também os testes de toxicidade crônicos parciais, que utilizam uma parte do ciclo de vida dos organismos, de preferência a mais sensível, sendo feitas as mesmas avaliações (ADAMS, 1995; BURTON e MACPHERSON, 1995 *apud* FRACÁCIO, 2006).

3.1.3 – Organismos-teste

Os testes de toxicidade crônica e aguda são realizados com o emprego de organismos os quais sejam habitantes dos ecossistemas aquáticos de forma que seja avaliado o efeito de um determinado poluente sobre a comunidade aquática. Estes organismos são conhecidos como organismos-teste e desempenham também importante papel na avaliação ecotoxicológica de efluentes das diversas origens.

Quanto à escolha de um organismo-teste, existem alguns critérios a serem considerados, tais como: sensibilidade a uma ampla gama de substâncias; abundância e disponibilidade; se possível a espécie deve ser endógena para melhor representatividade dos ecossistemas; importância comercial, recreacional ou ecológica; cosmopolização da espécie; facilidade de cultivo em laboratório; grande quantidade de informações disponível na literatura a respeito da biologia da espécie; ciclo de vida relativamente curto (RAND e PETROCELLI, 1985 *apud* FRACÁCIO, 2006).

Considerando-se a dificuldade em encontrar uma espécie com todas estas propriedades ideais, muitas espécies padronizadas podem ser utilizadas nos testes em laboratório, sendo extremamente importante a realização de bioensaios com espécies representativas do ambiente de estudo que melhor responderão as condições encontradas nos ambientes naturais onde vivem (FRACÁCIO, 2006).

Outro ponto importante quanto à escolha de um organismo-teste é a avaliação da sensibilidade deste organismo. Tal avaliação é feita através de testes de sensibilidade com substâncias de referência as quais são específicas para os respectivos 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. Recomenda-se que a sensibilidade das culturas seja avaliada dentro de 14 dias antes ou após a realização de ensaios de toxicidade, ou ainda paralelamente a estes (*ENVIRONMENT CANADA*, 1992a *apud* ZAGATTO E BERTOLETTI, 2006).

Segundo o *ENVIRONMENT CANADA* (1990) a habilidade de uma substância de referência realmente detectar lotes de organismos debilitados, ou geneticamente diferentes, ainda é pouco comprovada experimentalmente. Assim, segundo essa instituição, o objetivo dos ensaios ecotoxicológicos com substâncias de referência é avaliar a reprodutibilidade do método analítico em um determinado laboratório ao longo do tempo e, também, permitir comparações inter-laboratoriais.

Os microcrustáceos *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia dubia* são organismos-teste de ampla utilização no que diz respeito à avaliação ecotoxicológica de efluentes pelo fato de serem sensíveis à diversos compostos e assim possibilitando a obtenção de resultados precisos garantindo a repetibilidade e reprodutibilidade dos resultados.

Os microcrustáceos em geral desempenham um papel importante na cadeia alimentar, pois são consumidores primários, alimentam-se de algas e servem de alimento para os consumidores secundários, como peixes e outros vertebrados. Assim sendo, mudanças no comportamento destes organismos podem interferir nos outros níveis tróficos do ecossistema aquático (ALLAN, 1976; CETESB, 1999)

Outros pontos positivos no que diz respeito ao uso destes microrganismos são a possibilidade de cultivo em laboratório, ciclo de vida curto, facilidade na manutenção das culturas, disponibilidade dos organismos nas diferentes épocas do ano, facilidade na obtenção de lotes uniformes de organismos, etc.

A alga *Pseudokirchneriella subcapitata* também é bastante empregada para testes ecotoxicológicos crônicos. Uma das vantagens do emprego deste organismo é o fato de se tratar de um teste estático (no qual não há renovação das soluções teste ao longo do período de exposição). Além do uso deste organismo para a realização dos testes de toxicidade, a referida alga é considerada uma das mais adequadas para a alimentação dos microcrustáceos *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia dubia* (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2006).

Vibrio fischeri é uma bactéria marinha bioluminescente, anaeróbia facultativa, Gram negativa. Em geral, muitas bactérias marinhas são Gram-negativas, onde a parede celular, com membrana externa, fornece uma estrutura bem mais adaptada a ambientes aquáticos nutricionalmente diluídos. O lipopolissacarídeo (LPS) da membrana externa dessas bactérias protege contra certas moléculas tóxicas, como ácidos graxos e antibióticos, e pode servir para ligar importantes nutrientes provenientes da água. Enzimas hidrolíticas importantes são retidas no espaço periplasmático de bactérias

Gram-negativas, em vez de serem excretadas e perdidas no ambiente aquático, que seria no caso das Grampositivas (PELCZAR *et al.*, 1996 citado por PAIVA, 2004).

Vibrio fischeri pode ser encontrada em pequenas quantidades em oceanos, ou em grandes quantidades em áreas isoladas, ou associadas à órgãos luminosos de lulas. Quando em pequenas concentrações de células, *Vibrio fischeri* não emite luz, mas em altas densidades celulares estes organismos emitem luz azul-esverdeada. Este processo de controle da emissão de luz dependente da densidade celular, é ativado por auto-indução genética, que envolve a ligação de uma proteína ativadora transcritora com um sinal molecular auto-indutor, o qual é liberado pela bactéria dentro dos arredores de seu ambiente. Nos oceanos, a densidade destes organismos é cerca de 10² células por mL, sendo que esta pouca concentração celular não é suficiente para liberar o sinal auto-indutor, que não ativará os genes luminescentes. Mas quando estes organismos encontram-se inseridos dentro de um órgão luminoso, de lulas, por exemplo, a concentração celular é cerca de 10¹⁰ células por mL; esta alta concentração causa a auto-indução, e conseqüentemente, a emissão de luz pelas bactérias (STEVENS *et al.*, 1997; SCHAEFER *et al.*, 1996 citado por PAIVA, 2004).

O emprego da bactéria luminescente *Vibrio fischeri* (sistema Microtox®) para testes de toxicidade aguda é extremamente vantajoso pelo fato da simplicidade e da rapidez na obtenção dos resultados. A bactéria é exposta por alguns minutos ao composto tóxico e através de um equipamento é medida a intensidade luminosa antes e após a exposição. Este equipamento acoplado a um computador transmite os resultados obtidos os quais são convertidos através de um programa computacional em dados estatísticos que representem a toxicidade contida na amostra.

O sistema Microtox tem uma ampla aplicação, incluindo-se entre as principais: avaliação da toxicidade de efluentes industriais; avaliação da toxicidade de águas residuárias, a serem submetidas a tratamento biológico; determinação do risco potencial de novas substâncias químicas, através da avaliação de sua toxicidade; estudos relativos a sinergismo e antagonismo de misturas de substâncias tóxicas; avaliação de substâncias tóxicas no meio ambiente; avaliação da toxicidade de materiais usados em biomedicina; avaliação de águas subterrâneas quanto à possível presença de contaminantes tóxicos (IBAMA, 1987).

3.1.4 - Análise de resultados

Como em todo experimento onde se utilizam repetidas análises as quais resultam em um banco de dados, a organização e posterior apresentação dos resultados destas análises são feitas com o auxílio de ferramentas estatísticas.

No caso dos testes de toxicidade, o objetivo central é determinar a concentração do agente químico que causa, ou não efeito sobre uma população de organismos-teste. Os resultados podem ser colocados em gráficos, em que as porcentagens de organismos que exibem respostas específicas são representadas no eixo Y e as concentrações de exposição, no eixo X. Em geral, respostas mais severas (efeitos agudos) ocorrem em concentrações mais elevadas do agente tóxico e respostas menos severas (efeitos crônicos), em concentrações menores, como mostra a Figura 2 (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2006).

Em ensaios de toxicidade aguda, normalmente, procura-se estimar a concentração da substância teste que causa morte ou imobilidade a 50% da população exposta, durante um período de tempo determinado (24, 48, 72, 96 horas). Tal concentração pode corresponder a CE_{50} ou CL_{50} (concentração efetiva ou concentração letal mediana), obtidas a partir de dados binários, como número de vivos e de mortos (GELBER *et al.*, 1985 *apud* ZAGATTO e BERTOLETTI, 2006).

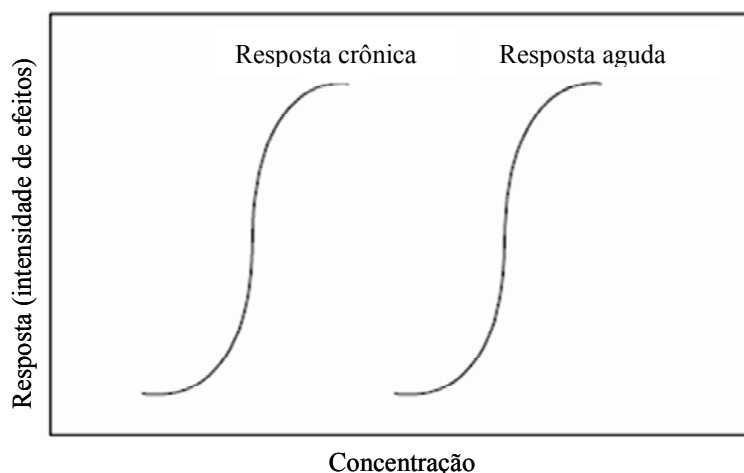


Figura 2 - Relação concentração-resposta clássica (USEPA, 2000 *apud* ZAGATO e BERTOLETTI, 2006).

Em ensaios de toxicidade crônica, o objetivo é definir, entre as concentrações utilizadas, aquela em que não são detectados efeitos de importância biológica sobre a variável de interesse (sobrevivência, reprodução, crescimento, etc.) (CAPIZZI *et al.*, 1985 *apud* ZAGATTO e BERTOLETTI, 2006). Tal concentração corresponde a CENO, a maior concentração que não causa efeito. Outros valores de interesse na quantificação da toxicidade crônica são a CEO, a menor concentração que causa efeito estatisticamente significativo e o VC, (valor crônico), obtido pela média geométrica entre CEO e CENO. Ainda para a toxicidade crônica pode-se quantificar o CIp, que é a concentração de inibição do crescimento da população em um percentual “p”. Este percentual é definido de acordo com o interesse do estudo. Para estudos com a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*, por exemplo, é comum o uso do CI₂₅, que seria a concentração de um determinado efluente que inibe o crescimento da alga em 25%.

A utilização de programas estatísticos computadorizados também é de uso comum para os testes de toxicidade. Como exemplo podemos citar os programas Probit, Dunnett, ICp, TSK, dentre outros os quais também encontram-se disponíveis na internet em www.epa.gov/nerleerd/stat2.htm#.

3.2 - Indústria de celulose

3.2.1 - Processo de produção da celulose

O setor produtivo brasileiro de papel e celulose contribui de forma relevante para o desenvolvimento do Brasil, sendo caracterizado pelo alto grau de investimento. O desempenho do setor de celulose em 2006, no Brasil, ultrapassou o Japão no ranking mundial de produtores, subindo para a sexta colocação mundial, segundo a BRACELPA (BIANCONI, 2006 *apud* SILVA, 2007).

O principal processo empregado na maioria das fábricas de celulose e papel no Brasil é o processo kraft. Este processo tem como principal objetivo a remoção da lignina e dos extrativos da madeira, e a produção da celulose branqueada a qual será posteriormente utilizada na fabricação de papel. A maior parte da produção brasileira é de celulose kraft branqueada de eucalipto, sendo que, grande parte é exportada, em virtude do baixo consumo de papel no Brasil. Portanto, devido ao grande volume de produção de celulose no país, grande é também o volume exportado.

O processo de produção de celulose kraft branqueada tem início com o plantio e colheita do eucalipto. A celulose são as fibras da madeira, que uma vez extraídas do

eucalipto, são utilizadas como matéria-prima na fabricação de papel. Na etapa de recebimento e preparação da madeira é feito o descascamento das toras de madeira que serão posteriormente picadas em pequenos cavacos de tamanho uniforme, os quais passarão por um cozimento químico. As cascas são usadas como combustível em caldeiras.

O cozimento consiste na dissolução dos cavacos com uma solução de hidróxido e sulfeto de sódio, também chamada de licor branco, a alta temperatura e pressão. Ao final desta digestão, a pasta de celulose, ainda marrom, é descarregada pelo fundo do digestor. Nesta etapa é produzido o licor preto o qual será removido na etapa posterior.

A etapa subsequente é a de lavagem e depuração. A pasta de celulose é lavada com água quente com a finalidade de retirar os resíduos do licor preto, recuperando o máximo possível dos reagentes usada no cozimento. Esta lavagem da celulose facilita o posterior branqueamento, reduzindo o consumo de alvejantes e principalmente tornando o efluente com menor carga de poluentes. A depuração consiste na separação, através de peneiramento, dos pedaços não cozidos da madeira, os quais podem ser retornados à etapa de cozimento.

A coloração marrom da celulose é motivada pela presença, ainda que reduzida, da lignina, a qual no início do cozimento encontra-se num teor de 25%. No branqueamento, com a aplicação de oxidantes, tais como oxigênio, dióxido de cloro, peróxido de hidrogênio, ozônio em quatro ou cinco etapas de reação e lavagem, faz-se a retirada do restante da lignina (reduzindo até um teor de 3%) e a celulose gradativamente adquire a sua coloração natural que é branca. Esta etapa é a responsável pela produção do maior volume de efluente na fábrica de celulose.

Após o branqueamento, a celulose é então enviada para a máquina de papel, em fábrica integrada, ou então secada e acondicionada em fardos de folhas de celulose, as quais serão encaminhadas para as fábricas de papel.

3.2.2 - Caracterização e tratamento de efluentes na indústria de celulose branqueada de eucalipto

Neste item serão abordados os efluentes de fábricas de celulose branqueada de eucalipto, a qual representa a grande maioria das fábricas brasileiras, e que, portanto, serão objeto de estudo desta pesquisa.

A indústria de papel e celulose é a sexta maior poluidora mundial (depois da de óleo, cimento, couro, têxtil e da indústria de aço) liberando uma variedade de gases,

efluentes líquidos e resíduos sólidos no meio ambiente (ALI e SREEKRISHNAN, 2001).

É a poluição dos corpos d'água, entretanto, que causa maior preocupação pelo fato da geração de grandes volumes de efluente por tonelada de celulose produzida, dependendo ainda da natureza da matéria-prima, do produto final e da capacidade de tratamento dos efluentes e do reúso da água dentro da empresa (ALI e SREEKRISHNAN, 2001). Fábricas de celulose geram uma faixa de 25 a 80 m³ de efluente por tonelada de celulose produzida (XAVIER *et al.*, 2006), sendo a média brasileira de 50 m³.

A caracterização dos efluentes de celulose, no que diz respeito à matéria orgânica, se dá pelos parâmetros de demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e demanda química de oxigênio (DQO). Outro parâmetro importante são os halógenos orgânicos adsorvíveis (AOX), os quais estão presentes em efluentes de celulose devido ao processo de branqueamento que utiliza compostos clorados.

Os efluentes de celulose são conhecidos por conterem compostos recalcitrantes. Isto está ligado ao fato de que tais efluentes possuem uma relação DBO/DQO muito baixa, o que indica uma baixa biodegradabilidade da matéria orgânica presente nestes efluentes. Em recente estudo, SILVA (2007) encontrou valores de DBO/DQO em torno de 0,4. Quanto mais esta relação se aproxima de unidade, mais fácil é a tratabilidade biológica do efluente em questão. Normalmente, quando esta relação é menor que 0,3, o tratamento biológico não é mais eficiente (METCALF e EDDY, 2003).

Durante o branqueamento da celulose por meio de compostos clorados, compostos halogenados tais como clorofenóis e cloroligninas são formados. Dentre estes compostos encontram-se alguns os quais são biologicamente persistentes, recalcitrantes e altamente tóxicos para o meio ambiente (BAIG e LIECHTI, 2001; THOMPSON *et al.*, 2001 *apud* MELLO *et al.*, 2006).

O desenvolvimento tecnológico dos métodos de lavagem e branqueamento da celulose e o racionamento no uso da água, aliado a um maior tempo de cozimento, diminuiu substancialmente o potencial poluidor das indústrias de papel e celulose. Em paralelo à implementação de modernas seqüências de branqueamento, sem uso de cloro molecular como agente oxidante, a carga de AOX decresceu em torno de 48 a 65% e a formação de compostos clorados caiu consideravelmente (KOSTAMO *et al.*, 2004). Com essas mudanças nos processos de branqueamento, as pesquisas com efluentes da indústria de celulose expandiram no sentido de incluir nos estudos, além dos compostos

clorados, os extrativos da madeira, tais como os esteróis. Estes extrativos formam espumas e são considerados impurezas para os produtos e equipamentos da indústria. (KOSTAMO e KUKKONEN, 2003).

Em geral as fábricas de celulose utilizam os processos convencionais de tratamento de efluentes que consistem em um tratamento preliminar, onde são removidos os sólidos grosseiros, tratamento primário, responsável pela remoção dos sólidos em suspensão através de decantadores, e o tratamento secundário, geralmente um tratamento biológico aeróbio, em sistemas de lagoas aeradas ou lodos ativados. Caso o efluente não atinja os padrões de lançamento pode-se ainda acrescentar um tratamento terciário (físico-químico) o qual ainda é pouco empregado para esta tipologia industrial. O tratamento biológico aeróbio de efluentes de celulose branqueada pode reduzir a DQO em até 70% e a DBO em níveis ainda superiores, podendo chegar a 90% de remoção.

Adota-se também para algumas fábricas tratamentos complementares, afim de se aumentar a eficiência de remoção da matéria orgânica. Uma das tecnologias adotadas é o Moving Bed Biofilm Reactor (MBBR) que é também conhecido como Biorreator de Leito Móvel. O que diferencia este tipo de tratamento é que no tanque de aeração estão dispersas no efluente a ser tratado peças plásticas nas quais a biomassa irá crescer aderida e, desta forma, aumenta-se o tempo de permanência da biomassa no reator e conseqüentemente há um ganho de eficiência no processo (JORDÃO, 2008).

3.2.3 - Efeitos de efluentes de celulose nos ecossistemas aquáticos

Os efeitos dos efluentes de papel e celulose em ambientes aquáticos têm sido avaliados nos últimos 40 anos, e estudos de efeitos diretos têm sido conduzidos desde 1970. Durante este período, efeitos ambientais foram observados, normas foram implementadas, e a indústria se adequou a estas normas resultando em significativa redução nos efeitos ambientais de caráter agudo (HEWITT e MARVIN, 2005).

Um dos primeiros efeitos diretos destes efluentes foi investigado por DAS *et al.* (1967) que indiretamente remetiam ao composto tetracloro-o-benzoquinona e outros clorodihidroxibenzenos a toxicidade aguda em peixes do licor produzido na cloração no processo kraft. Estudos conduzidos durante os anos de 1970 e 1980 continuaram a investigar o processo kraft, particularmente nos estágios de cloração e extração do branqueamento e nos produtos químicos responsáveis pela toxicidade aguda em peixes. Destas investigações, ácidos resinosos, ácidos graxos insaturados e fenóis clorados

foram apontados como responsáveis pela maior fonte de toxicidade aguda (HEWITT e MARVIN, 2005). Contudo, ácidos resinosos não estão presentes em madeira de eucalipto e, portanto, também não estão presentes nos efluentes de celulose branqueada de eucalipto.

Como resultado, a indústria adotou mudanças nos processos produtivos e de tratamento de efluentes, durante os anos 1990 para reduzir as cargas destes compostos no ambiente. Enquanto benefícios óbvios vieram destes esforços, efeitos sutis na reprodução de peixes, apontados pela primeira vez nos anos 1980, ainda persistem até hoje (HEWITT e MARVIN, 2005).

Em um dos seus estudos XAVIER *et al.* (2006) avaliaram a toxicidade aguda, utilizando os organismos *Daphnia magna* e *Daphnia obtusa*, para compostos específicos. Não foi encontrada toxicidade aguda quando se avaliou a toxicidade separadamente para dois fitoesteróis: β -sitosterol e stigmasterol ($CL_{50} > 100\%$). Entretanto, quando se avaliou os dois compostos juntos, encontrou-se toxicidade aguda ($CL_{50} = 21\%$), mostrando o efeito de sinergismo existente para estas substâncias, as quais estão presentes em efluentes de celulose branqueada de eucalipto.

Em um outro estudo SOBREIRA *et al.* (2006) encontraram resultados semelhantes para a toxicidade específica do composto β -sitosterol e do ácido graxo hexadecanóico. O organismo-teste utilizado foi *Daphnia similis* e os resultados encontrados mostraram que nem mesmo para concentrações destes extrativos dez vezes maiores que as presentes nos efluentes setoriais da Aracruz Celulose não se detectou toxicidade aguda. Entretanto, para o efluente misto encontraram-se valores de CE_{50} em torno de 50%.

Em recente pesquisa MELLO *et al.* (2006) avaliaram a toxicidade de efluentes de celulose utilizando a alga verde *Selenastrum capricornutum* (atualmente conhecida como *Pseudokirchneriella subcapitata*). Os autores testaram diferentes concentrações do efluente bruto em um tempo de exposição de 72 horas. Os testes mostraram que para uma concentração de 86,7% do efluente (concentração mais alta testada) houve uma inibição em 39% no crescimento da referida alga, apontando para a existência de toxicidade crônica para este tipo de efluente quando não tratado. Ainda neste estudo os autores constataram a eliminação completa da toxicidade crônica quando se tratou o efluente através da ozonização (14 mg/L de O_3 em um tempo de exposição de 1 hora).

Em estudo semelhante SPONZA (2003) avaliou a toxicidade para diferentes organismos e dentre eles a alga *Chlorella* sp. Os resultados mostraram diferentes

respostas à exposição da alga ao efluente de celulose, que variaram desde efeitos agudos a até mesmo um estímulo ao crescimento da alga. Estes resultados mostram a importância do monitoramento ecotoxicológico constante destes efluentes com o intuito de avaliar as causas dessas variações e eliminar os efeitos tóxicos.

Neste sentido, um estudo realizado no Laboratório de Avaliação Ecotoxicológica da UFSC, avaliou o potencial da alga *Scenedesmus subspicatus* como bioindicador da toxicidade de efluentes de papel e celulose. Os resultados obtidos demonstraram que o efluente potencializou o crescimento da alga quando presente em concentrações até 25% (v/v), acima deste valor, a taxa de crescimento foi inibida proporcionalmente ao aumento da concentração de efluente (MEDEIROS, 2003 *apud* PAIVA, 2004).

Os efeitos crônicos para os efluentes de celulose também foram encontrados em um estudo realizado por GONÇALVES *et al.* (1999) no qual foi utilizado o organismo-teste *Ceriodaphnia dubia*. Neste estudo foi feito um diagnóstico da toxicidade para os efluentes de cada etapa do branqueamento da celulose. Os resultados mostraram que o efluente da seqüência de branqueamento ECF (Elemental Chlorine Free) apresentou maior toxicidade crônica em relação à seqüência TCF (Totally Chlorine Free). Esta constatação mostra a relação da toxicidade com os compostos clorados e, além disso, mostram a eficiência da remoção da toxicidade crônica através do processo de ozonização, etapa final da seqüência TCF para o efluente analisado. Contudo os autores alertam para o efeito mutagênico deste efluente oriundo do estágio com ozônio, efeito que foi constatado pelo teste de Ames (atividade mutagênica) com o organismo-teste *Salmonella typhimurium*.

Apesar dos tratamentos secundários reduzirem a toxicidade, efluentes de celulose ainda apresentam efeitos crônicos em organismos aquáticos. Em um de seus estudos KOSTAMO E KUKKONEN (2003) ratificaram o bom desempenho e estabilidade operacional dos sistemas de lodos ativados no tratamento de efluentes de celulose. Entretanto, as concentrações de esteróides no efluente de saída ainda permaneciam em um valor tal que poderia provocar efeitos crônicos nos organismos do corpo receptor. A maioria destes extrativos da madeira se encontrava aglutinado com as partículas em suspensão e, desta forma, uma importante conclusão destes autores é que uma melhoria no sistema, no sentido de uma maior remoção de partículas finas, pode também aumentar a remoção dos esteróides.

Estudos recentes têm focado principalmente os extrativos da madeira e seus efeitos nos efluentes. Em particular, esteróis de plantas têm provocado distúrbios

hormonais em muitos organismos aquáticos. Foi demonstrado que esteróis afetam o crescimento, a reprodução e o desenvolvimento em peixes (KOSTAMO *et al.*, 2004). Além disso, ácidos resinosos e graxos insaturados são tóxicos a organismos aquáticos. Mesmo em baixas concentrações de esteróis, ácidos graxos podem provocar efeitos crônicos. Por exemplo, os efeitos crônicos dos ácidos insaturados podem ocorrer em concentrações de 20 mg.L⁻¹ (KOSTAMO *et al.*, 2004).

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - Caracterização do objeto de estudo

Para a realização deste trabalho foram coletadas amostras de efluentes da Unidade Mucuri da Suzano Papel e Celulose a qual tem sua origem na Bahia Sul Celulose S.A. A Companhia Suzano – unidade Mucuri, é uma fábrica integrada de celulose kraft branqueada e papel, localizada no município de Mucuri, Bahia. Em setembro de 2007 foi dada a partida de uma nova linha de produção de celulose, com uma capacidade de produção de aproximadamente 1 milhão de toneladas/ano de celulose. Assim, a produção total anual da fábrica é de 1.685.000 toneladas de celulose e 255.000 toneladas de papel de imprimir e escrever.

O branqueamento da celulose é feito em duas linhas: a primeira segue a seqüência DualD(EOP)D₁(PO) e a segunda linha a seqüência A/D(EOP)D₁P, onde DualD = tratamento com dióxido de cloro a quente; A/D = tratamento com ácido seguido de tratamento com de dióxido de cloro; EOP = extração alcalina reforçado com oxigênio e peróxido de hidrogênio; D₁ = tratamento com dióxido de cloro; PO = tratamento com peróxido de hidrogênio pressurizado, reforçado com oxigênio e P = tratamento com peróxido de hidrogênio pressurizado.

Com a partida da nova fábrica, a geração de efluentes líquidos aumentou de uma vazão de 3.588 m³ h⁻¹ para aproximadamente 5.500 m³ h⁻¹ que são encaminhados para uma Estação de Tratamento de Efluentes (ETE) antes de serem lançados no corpo d'água receptor, o rio Mucuri.

A Bacia Hidrográfica do Rio Mucuri está inserida na mesorregião do Vale do Mucuri, onde estão municípios como Teófilo Otoni e Nanuque. A bacia possui uma população estimada de 296.845 habitantes, abrange um total de 13 sedes municipais e apresenta uma área de drenagem de 14.640 km². O clima na bacia é considerado semi-úmido, com período seco durando de quatro a cinco meses por ano, com exceção da divisa com o Espírito Santo, onde o clima é úmido e o período seco tem duração de um a dois meses por ano. A disponibilidade hídrica situa-se entre 2 e 10 litros por segundo por quilômetro quadrado, com exceção do divisor com o rio São Mateus, onde se situa entre 10 e 20 litros por segundo por quilômetro quadrado, com uma Q_{7,10} de 17 m³/s. O Comitê de Bacia Hidrográfica do Rio Mucuri encontra-se em processo de formação (IGAM, 2008). No que diz respeito ao enquadramento nas classes de águas doces

(Resolução CONAMA 357/2005) o Rio Mucuri pertence à classe 2. A Figura 3 mostra o Rio Mucuri, à jusante da fábrica de celulose.



Figura 3 – Foto aérea do Rio Mucuri à jusante da Fábrica da Suzano

Os efluentes gerados nas diversas áreas de produção são divididos em duas linhas: Linha I - Efluente geral ou alcalino - composto por todos os efluentes industriais e esgoto sanitário, exceto o efluente ácido do branqueamento; Linha II - Efluente do estágio ácido do branqueamento.

O efluente da Linha 1 passa pelo sistema de gradeamento para remoção de materiais e sólidos grosseiros e pelo tratamento primário para a remoção dos sólidos em suspensão. O sistema de tratamento primário é composto por três decantadores circulares, sendo que dois decantadores (1 e 2) possuem 35 m de diâmetro e o decantador 3 possui 39 m de diâmetro.

Todos os decantadores dispõem de pontes raspadoras com tração periférica e remoção central do lodo decantado. O lodo é retirado dos decantadores com consistência em torno de 2% através de bombas centrífugas e, a seguir, é enviado para dois adensadores (espessadores) circulares de lodo, sendo um com 8 m de diâmetro e o outro com 9,6 m. O lodo depositado no fundo dos adensadores apresenta consistência entre 4 a 5%. A desidratação deste lodo é realizada por duas prensas desaguadoras tipo

“Screw press” e o material resultante, que possui uma consistência média de 30 a 40%, é utilizado nas áreas de plantio de eucalipto, após passar por um processo de compostagem.

A mistura dos efluentes alcalino e ácido do branqueamento é realizada em um tanque de mistura, onde o pH final é acertado para uma faixa de 5 a 9, podendo requerer adição de ácido sulfúrico ou leite de cal, a depender do processo. Depois de passar pelo tanque de mistura, o efluente é encaminhado para três torres de resfriamento e seguem para uma lagoa aerada facultativa, equipada com 119 aeradores superficiais de alta rotação de potência igual a 25 CV e 25 aeradores de 50 CV, sendo que são utilizados em média 135 aeradores. Os aeradores, além de fornecer o oxigênio necessário ao crescimento bacteriano, são também responsáveis pela manutenção da mistura da lagoa. A lagoa foi projetada de maneira a proporcionar um fluxo hidráulico, tipo pistão (plug-flow) possuindo um comprimento útil de 2.536 m, largura na lâmina d'água igual a 67,6 m e profundidade útil de 3,5 m perfazendo um volume igual a aproximadamente 600.000 m³. A lagoa aerada é seguida por três reatores de crescimento aderido denominados MBBR (Moving Bed Biofilm Reactor) em série e de uma lagoa de decantação que possui um volume útil aproximado de 135.000 m³.

Há, ainda, duas lagoas de emergência, sendo a primeira com um volume útil teórico igual a 88.300 m³ e que retorna o efluente para a entrada da lagoa aerada, e a segunda lagoa, construída mais recentemente, com um volume útil aproximado de 45.500 m³ e que retorna o efluente para a elevatória do efluente alcalino.

As dosagens de uréia e ácido fosfórico são feitas no início da lagoa de aeração de forma a manter um nível na entrada da lagoa aerada igual a 2,5 mg L⁻¹.

As dimensões das principais unidades são resumidas na Tabela 2 e a Figura 4 mostra algumas destas unidades de tratamento.

Tabela 2 – Dimensões das unidades de tratamento da ETE-Suzano - Mucuri

| Tratamento | Descrição | Quantidade | Dimensões/Capacidade |
|-------------------|---|---|---|
| <i>Primário</i> | Decantador circular | 3 | 2 x diâmetro 35 m 1 x diâmetro 39 m |
| | Adensador de lodo | 2 | 2 x diâmetro 8 m 1 x diâmetro 9,6 m |
| | Tanque de acúmulo de lodo | 1 | 100 m ³ |
| | Filtro prensa (screw press) | 2 | 40 TSS d ⁻¹ |
| <i>Secundário</i> | Torre de resfriamento | 3 | 5575 m ³ h ⁻¹ |
| | Lagoa aerada | 1 | 119 aeradores 25 CV + 25 aeradores 50 CV 600.000 m ³ |
| | MBBR | 3 | Diâmetro = 27 m H = 9 m Área material suporte = 450.000 m ² 3 sopradores de ar 9600 Nm ³ h ⁻¹ x 9,5 mca |
| | Lagoa de decantação | 1 | 135.000 m ³ |
| | Lagoa de emergência | 2 | 88.300 m ³ 45.000 m ³ |
| <i>NUTRIENTES</i> | Dosagem média de uréia Dosagem média de ácido fosfórico | kg d ⁻¹ l d ⁻¹ | 4342 1520 |

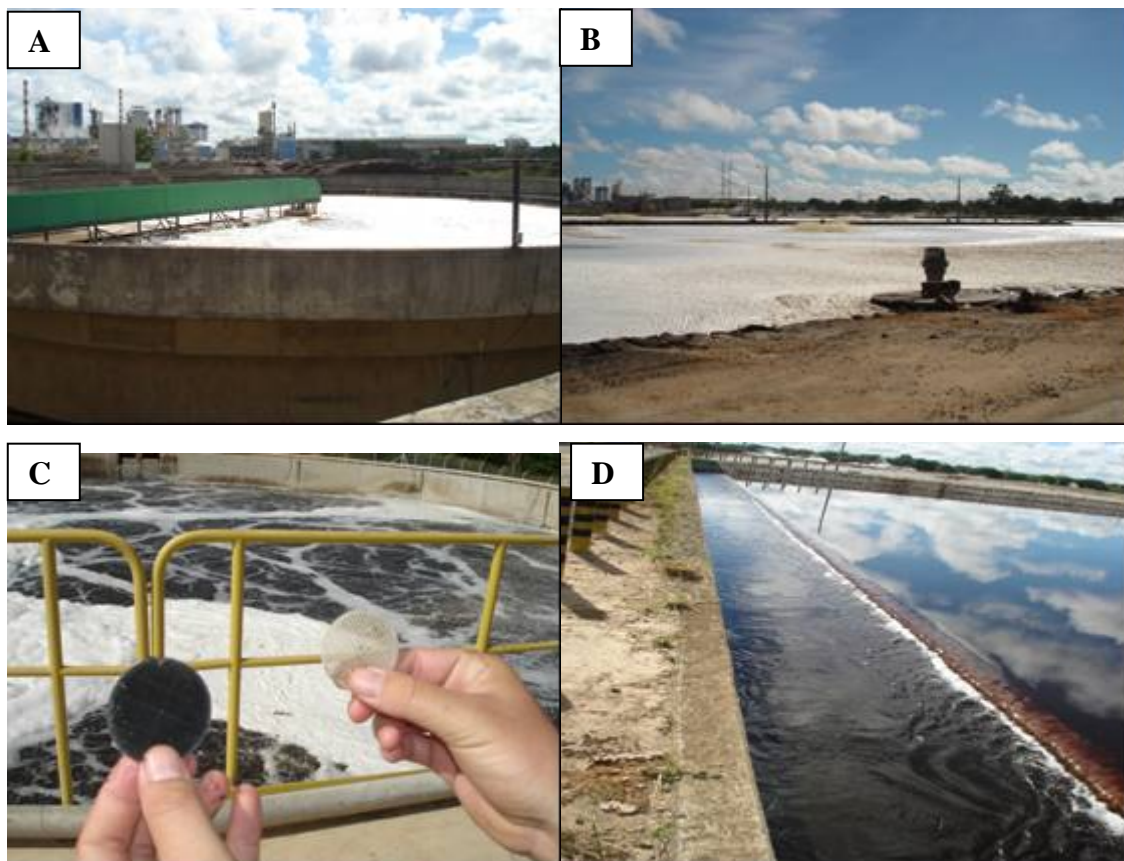


Figura 4 – Sistema de tratamento de efluente da fábrica da Suzano. A: Decantador primário; B: Lagoa aerada C: Reator MBBR (meio suporte limpo, a direita e cheio de biomassa, esquerda) D: Lagoa de polimento (saída do tratamento).

As amostras foram coletadas em cinco diferentes pontos do sistema biológico de tratamento de efluentes da fábrica com o objetivo de se avaliar as etapas de tratamento e as respectivas eficiências de remoção dos parâmetros físico-químicos e da toxicidade. As coletas foram feitas num período de quatro meses (maio a agosto de 2008), período no qual foram coletadas três amostras para cada ponto nesse período. A Figura 5 mostra um esquema do sistema de tratamento adotado na Suzano, com os pontos de amostragem definidos. O Quadro 1 lista estes pontos de amostragem, as datas de coleta e a convenção usada neste trabalho para identificar as amostras.

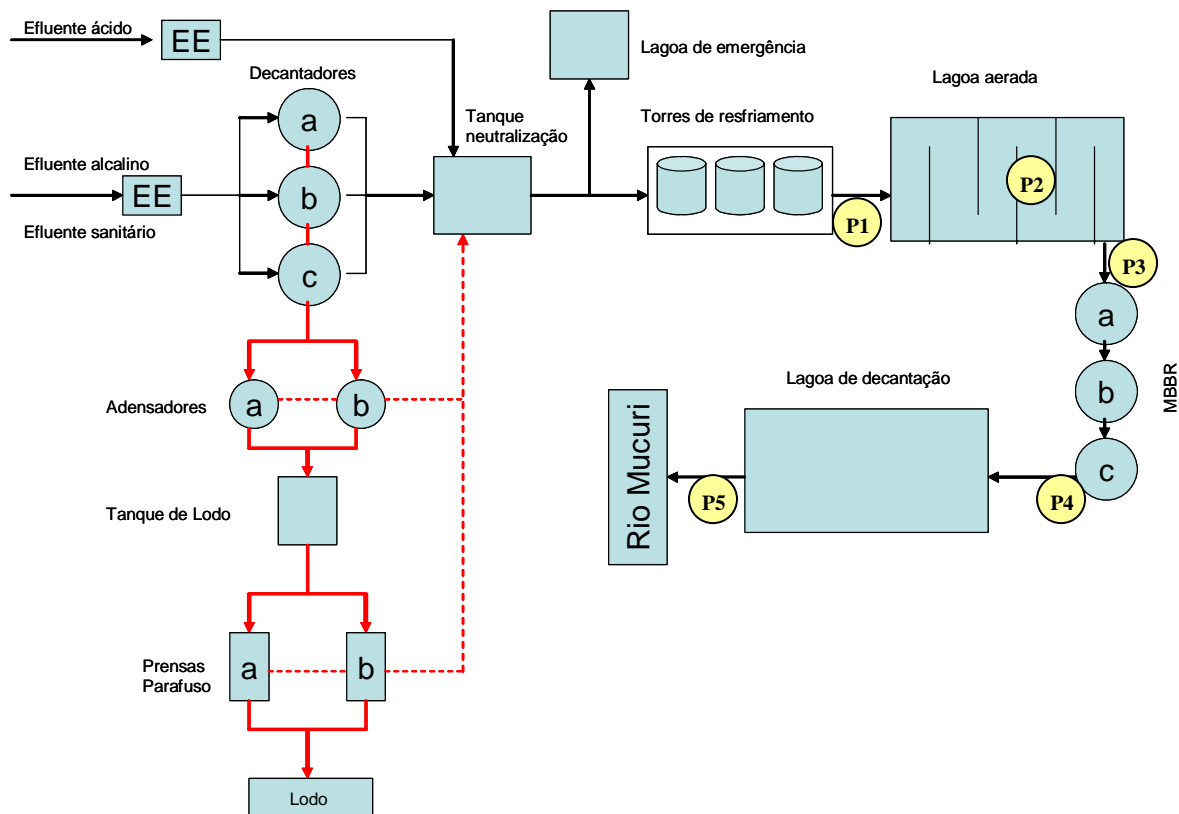


Figura 5 – Esquema do sistema de tratamento de efluentes da Suzano Papel e Celulose – unidade Mucuri e pontos de coletas de amostra.

Tabela 3 – Pontos de coleta das amostras analisadas

| Pontos de coleta | Datas de coleta | | |
|-------------------------------------|-----------------|----------|----------|
| | 19/05/08 | 07/07/08 | 07/08/08 |
| Entrada da lagoa aerada | P1 | P1' | P1'' |
| Ponto intermediário da lagoa aerada | P2 | P2' | P2'' |
| Entrada do MBBR | P3 | P3' | P3'' |
| Saída do MBBR | P4 | P4' | P4'' |
| Saída do sistema | P5 | P5' | P5'' |

4.2 - Análises físico-químicas

A realização das análises físico-químicas de pH, DBO, DQO, dureza, cor e condutividade seguiram os procedimentos descritos pelo *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 1998). O Quadro 2 mostra os parâmetros analisados e seus respectivos métodos de análise e unidades de quantificação.

Tabela 4 – Parâmetros físico-químicos de análise das amostras e suas respectivas metodologias analíticas e equipamentos utilizados

| Parâmetro | Unidades | Método de análise | Equipamento empregado |
|---------------|------------------------|--|-----------------------|
| DBO | mg/L O ₂ | Winkler modificado pela azida (titulometria) | — |
| DQO | mg/L O ₂ | Colorimétrico | Hatch DR/2000 |
| pH | - | Medição direta | Digimed Dm2 |
| Dureza | mg/L CaCO ₃ | Titulometria | — |
| Cor | uH | Colorimétrico | Hatch DR/2000 |
| Condutividade | μS/cm | Medição direta | Digimed Dm2 |

4.3 - Ensaios ecotoxicológicos

Os efluentes foram submetidos a uma avaliação ecotoxicológica através de ensaios de toxicidade aguda e crônica. Os organismos foram escolhidos com base nos estudos já existentes para este tipo de efluente e também considerando a disponibilidade e viabilidade em cultivar os mesmos no laboratório de Ecotoxicidade da Universidade Federal de Viçosa – MG. Este laboratório foi criado em março de 2008, para fins desta pesquisa, pioneira na referida Universidade. Além disso, é importante destacar a relevância deste trabalho no sentido de deixar montado e equipado um laboratório que subsidiará pesquisas posteriores. O laboratório de Ecotoxicidade localiza-se na Divisão de Água e Esgoto da referida universidade, mais especificamente no Laboratório de Controle de Qualidade da Água. Neste laboratório foram padronizadas as condições de cultivo dos daphnídeos *Daphnia similis*, *Ceriodaphnia dubia* e da alga verde *Pseudokirchneriella subcapitata*.

4.3.1 – Teste de viabilidade

Foi realizado um teste de viabilidade, conforme descrito na norma da CETESB L5018 (1994), para a escolha da água de cultivo para os cladóceros *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia dubia*.

Foi submetida a este teste a água de um manancial que atendesse às características de qualidade da água requeridas para o cultivo destes organismos de forma que pequenos ajustes fossem necessários. Assim sendo, foi escolhida e testada

com o microcrustáceo *Daphnia similis*, a água de um bairro afastado do centro de Viçosa (Bairro Acamari) o qual utiliza como fonte de captação de água um poço artesiano. Este manancial atendia bem as características desejadas para o cultivo dos microcrustáceos. O teste foi feito em placas de petri de 100 mL e foram adicionados 10 neonatos de *Daphnia similis* em cada placa com 100 mL da água a ser testada. Ao final de um período de 48 h foi avaliada a sobrevivência dos organismos.

4.3.2 – Cultivo dos microcrustáceos

O cultivo dos microcrustáceos *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia dubia* foi estabelecido, para o laboratório de ecotoxicidade da UFV, através das experiências cotidianas adquiridas e do contato interlaboratorial, de forma a se obter uma maior produção de neonatos para a realização dos testes, e também com o objetivo de facilitar os procedimentos de cultivo necessários. As normas da CETESB, da ABNT e da USEPA foram utilizadas como base para a definição dos procedimentos a serem empregados. Aos poucos se chegou a um procedimento operacional padrão, o qual pode ser definido pelas etapas a seguir.

Preparo e controle do meio de cultivo

Como meio de cultivo destes organismos utilizou-se a água testada previamente através do teste de viabilidade e alguns ajustes foram feitos. A dureza desta água estava já em uma faixa adequada (40 a 48 mg/L, recomendada pela norma), e, portanto, não foi necessário fazer ajustes. A oxigenação foi feita através de pedra porosa e bomba de aeração com o objetivo de saturar a água de oxigênio, e posteriormente ajustou-se o pH para o valor desejado (pH = 7,0). Também foi adicionado um complexo vitamínico Fishtamin (Sera, Alemanha) à água de cultivo a fim de aumentar o crescimento e a reprodução dos organismos. A cada lote de água de cultivo preparado anotava-se todos os dados das análises físico-químicas. Quando da realização dos testes de ecotoxicidade também fez-se necessário a realização de análises físico-químicas (pH, condutividade, OD e temperatura) nas soluções-teste antes e depois dos testes com as amostras.

Alimentação dos microcrustáceos

A alimentação dos microrganismos foi feita as segundas, quartas e sextas-feiras com a alga *Pseudokirchneriella subcapitata* e alimento composto por ração de peixe e

levedura. A quantidade a ser adicionada foi de 5×10^4 células por litro de meio de cultivo para a alga, e, de 0,02 mL de alimento composto por microcrustáceo.

A cultura líquida da alga *Pseudokirchneriella subcapitata*, que era usada para a preparação do alimento para os organismos, era mantida sob iluminação de 2000 lux e aeração moderada e constante. A cada semana era renovado o meio de cultivo desta cultura líquida (meio oligo) e mensalmente preparava-se uma nova cultura líquida através da repicagem de uma cultura sólida em placa de petri. Esta cultura sólida servia de estoque da referida alga e tem como prazo de validade 6 meses, sendo necessário portanto preparar periodicamente novas placas.

Quando a cultura líquida encontrava-se em fase de exponencial (caracterizada pela coloração esverdeada) extraía-se uma fração que seria usada para o preparo do alimento. O preparo consiste em remover a solução de cultivo (meio oligo), composta por diversos sais, os quais podem ser tóxicos aos microcrustáceos. A remoção desta solução foi feita através de sucessivas centrifugações em 4000 rpm por um período de 5 minutos. Após cada centrifugação fazia-se o descarte do sobrenadante e a lavagem das células de alga com água destilada. Ao final diluía-se a massa de algas em água de cultivo (a mesma utilizada para o cultivo dos microcrustáceos). Em seguida fazia-se a contagem de células em microscópio eletrônico e calculava-se a quantidade a ser fornecida de forma a atingir a quantidade de células desejada (5×10^4 células por litro de meio de cultivo).

O preparo do alimento composto foi feito da seguinte forma: primeiramente preparava-se a ração de peixe a qual deveria ser digerida de forma a transformar os flocos da ração em uma solução homogênea, evitando que os flocos se prendam nas nadadeiras dos microcrustáceos. A digestão era feita através da aeração por 4 horas da ração de peixe em flocos em água destilada. Após este período de tempo, filtrava-se a solução obtida e estocava-se em potes de 100 mL à -4°C .

A preparação do alimento composto era feita semanalmente. A levedura era previamente preparada através da diluição de 5 g de fermento biológico em 100 mL de água destilada. Para facilitar a diluição e a homogeneização batia-se a solução em liquidificador. Posteriormente misturava-se os 100 mL da solução de levedura com 100 mL da ração de peixe digerida, preparada anteriormente. Com o alimento composto pronto anotava-se a data de preparo e adicionava-se 0,02 mL de alimento composto por microcrustáceo.

Culturas em massa

As culturas em massa eram mantidas em potes de vidro com o objetivo de produzir os neonatos para os testes de toxicidade. Para tanto, necessita-se controlar as idades destas culturas, fazer a troca do meio de cultivo e fornecer alimento periodicamente. A troca do meio de cultivo era feita as segundas, quartas e sextas-feiras. Sempre que se trocava o meio de cultivo alimentavam-se as culturas e mediam-se os parâmetros físico-químicos do meio antigo e do meio novo. A transferência dos adultos era feita com todo o cuidado de forma a não estressar organismos. Também era feito um controle da sobrevivência dos organismos anotando-se a cada troca de meio o número de sobreviventes em cada pote. Além disso, às 6^{as} feiras iniciava-se sempre uma nova cultura de microcrustáceos (com 50 neonatos de *Daphnia similis* e 60 neonatos *Ceriodaphnia dubia*). Neste mesmo dia também era descartada uma cultura antiga (com 4 semanas de idade). Assim, mantinham-se sempre culturas de 1, 2 e 3 semanas de idade. Estas culturas eram preservadas à 23°C e sob iluminação de 500 lux. Os neonatos utilizados para os testes de toxicidade eram retirados dos potes de cultura onde houvesse uma maior sobrevivência dos adultos e o preparo dos testes era feito normalmente as terças e quintas-feiras.

Para o cultivo da alga verde *Pseudokirchneriella subcapitata* o procedimento adotado é o descrito anteriormente para o preparo do alimento (alga). A manutenção das culturas de alga serve tanto para o preparo de alimento quanto para a realização dos testes de toxicidade.

4.3.3 – Testes de sensibilidade

Para garantir a validação dos testes de toxicidade anteriormente descritos foi necessária a realização de testes com substâncias de referência, denominados testes de sensibilidade. Estes testes estão também descritos nas normas da CETESB, para cada organismo-teste, e, para cada um utiliza-se uma ou mais substâncias de referência. A Tabela 3 mostra para cada organismo-teste utilizado a substância de referência escolhida e a faixa de concentração utilizada para os testes de sensibilidade.

Tabela 5 – Substâncias de referência e suas respectivas faixas de concentração utilizadas para os testes de sensibilidade

| Organismo teste | Substância de referência | Faixa de concentração |
|--|---------------------------------|------------------------------|
| <i>Daphnia similis</i> | NaCl | 1,6 a 3,6 (g/L) |
| <i>Ceriodaphnia dubia</i> | NaCl | 1,0 a 2,2 (g/L) |
| <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> | CuSO ₄ | 0,03 a 0,5 (mg/L) |

Os testes de sensibilidade foram feitos em paralelo aos testes de toxicidade, de forma a conferir uma maior confiabilidade aos resultados encontrados para os testes com as amostras, conforme o recomendado pela norma.

4.3.4 - Toxicidade aguda

Para a avaliação da toxicidade aguda foram utilizados dois organismos-teste.

a) Teste estático de curta duração, utilizando a bactéria marinha luminescente *Vibrio fischeri* - Sistema Microtox®. O procedimento para execução desse bioensaio é descrito detalhadamente no Manual da *MICROBICS CORPORATION* (1992). O teste se baseia na verificação da quantidade de luz produzida por suspensões bacterianas expostas a diferentes concentrações da amostra potencialmente tóxica. A diminuição da luz emitida por esta espécie fosforescente indica uma alteração metabólica grave no organismo. A expressão dos resultados é feita através do valor da CE₅₀ devendo-se especificar o tempo correspondente de exposição da suspensão bacteriana às diferentes concentrações da amostra em teste (5, 10, 15, 20 e 30 minutos), a temperatura em que foi realizado o ensaio (15°C) e o pH da amostra (7,0). Se não for observada inibição na produção de luz pelo microrganismo-teste, o resultado pode ser relatado como ausência de efeito tóxico da amostra analisada, nas condições do teste.

Para a realização do teste com o efluente aqui estudado foi feita previamente uma filtração das amostras e ajuste de pH. Inicialmente fez-se um teste apenas com as amostras da entrada do sistema de tratamento (efluente bruto), e caso fosse encontrado algum efeito tóxico posteriormente seriam feitas as análises para os demais pontos ao longo do sistema de tratamento. As concentrações de exposição foram de 5%, 11%, 22% e 45% além do controle, e os tempos de exposição foram de 5 e 15min. Estas concentrações são padronizadas para o teste e não se puderam acrescentar concentrações ou mesmo alterá-las.

Os testes foram feitos com o auxílio do programa computacional *Microtox Omni Windows Software*. Com o uso deste programa obteve-se o resultado imediato das

análises através de um computador acoplado ao fotômetro (aparelho que quantifica a luz emitida pelas bactérias). O programa gera como resultado final um gráfico no qual são plotadas as concentrações de exposição e o efeito tóxico presente em cada uma delas. Além do gráfico o programa calcula a CE_{50} para a amostra analisada.

b) Teste estático de 48 horas, com avaliação da sobrevivência do microcrustáceo *Daphnia similis*. Este ensaio seguiu as recomendações da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB L5.018, 1994), além de ter também como referência a norma da ABNT NBR 12713/2004 e o manual de ensaios de toxicidade aguda da Agência de Proteção Ambiental Americana (USEPA, 2002a).

Os organismos foram expostos a diferentes concentrações do efluente por um período de 48 horas e fotoperíodo de 12 horas. Para cada concentração, e também para o controle (feito com água de cultivo), preparavam-se quatro réplicas. Foram utilizados copinhos descartáveis transparentes para a exposição dos microrganismos. Em cada copinho eram colocados cinco neonatos e o alimento (alga + alimento composto), nas mesmas proporções utilizadas nas culturas em massa.

Ao término das 48 horas de exposição, foi feita uma contagem dos organismos imobilizados e/ou mortos em cada concentração do efluente em um teste preliminar, utilizando as concentrações de 6,25%, 12,5%, 25%, 50%, 100% e o controle. Posteriormente, com os resultados encontrados, estabeleceu-se o intervalo de concentrações de 50 a 100%, no qual foi realizado o teste definitivo. Com os dados obtidos no ensaio definitivo, determinou-se a CL_{50} 48 horas e seu intervalo de confiança, com auxílio dos programas computacionais PROBIT e TRIMMED SPEARMAN KARBBER (TSK).

4.3.5 - Toxicidade crônica

A toxicidade crônica foi avaliada com dois organismos-teste.

a) Teste semi-estático com duração de oito dias, da avaliação da sobrevivência e reprodução do microcrustáceo *Ceriodaphnia dubia*. Este ensaio seguiu as recomendações da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo CETESB L5.022, (1991), além de ter também como referência a norma ABNT NBR 13373 (2003) e o manual de ensaios de toxicidade crônica da Agência de Proteção Ambiental Americana USEPA, (2002b).

O teste consistiu na exposição do organismo a diferentes concentrações do efluente por um período de oito dias. As concentrações de exposição utilizadas foram de

6,25%, 12,5%, 25%, 50% e 100% além do controle, sendo que para cada concentração preparou-se 10 réplicas. O teste foi realizado à temperatura média de 23°C e fotoperíodo de 12 horas. Durante o teste, a cada 48 horas fazia-se a renovação das soluções-teste, transferindo-se os adultos para uma nova solução, contabilizando-se os adultos sobreviventes e os neonatos.

A toxicidade para este organismo-teste foi mensurada pela sobrevivência das fêmeas e pela reprodução das mesmas. Ao final dos testes foram quantificados a CE_{50} , com o auxílio do programa TSK, e os valores de CENO, a CEO e o valor crônico (VC) dos efluentes, com os dados resultantes da análise estatística com o teste Dunnett.

b) Teste estático de crescimento da alga verde *Pseudokirchneriella subcapitata* (96 horas). Este ensaio seguirá as recomendações da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo CETESB L5.020, (1991), além de ter também como referência a norma da ABNT NBR 12648 (2004) e o manual de ensaios de toxicidade crônica da Agência de proteção Ambiental Americana USEPA, (2002b). A biomassa foi quantificada através da construção de uma curva, a qual relaciona a concentração da solução teste e a absorbância a 750 nm. A curva foi construída antes de se iniciar os testes e dela foi extraída a equação que serviu de base para as análises feitas. Isto facilitou o procedimento analítico e a obtenção dos resultados. Através da equação obteve-se, através da leitura direta de absorbância no espectrofotômetro, a quantidade de células por mililitro de solução sem precisar fazer contagem direta no microscópio. Esta curva encontra-se no ANEXO B.

Para o teste foram preparadas seis concentrações do efluente e mais o controle. As soluções-teste foram preparadas nas concentrações do efluente de 6,25%, 12,5%, 25%, 50%, 75% e 100%, além do controle, que continha apenas o meio de cultura da alga (meio oligo). A forma de preparo das soluções-teste estão em uma tabela que encontra-se no ANEXO B, e seguiram as recomendações da norma ABNT-NBR 12648 (2004). O teste foi realizado em erlenmeyers de 250 mL, autoclavados e mantidos tampados com rolha de algodão durante todo o período do teste. A temperatura foi mantida em torno de 25°C, a iluminação era constante e de 4500 lux e os frascos ficavam sob agitação constante de 100 rpm (mesas agitadoras).

Antes e após o período do teste (96 horas) fazia-se a leitura em espectrofotômetro das soluções-teste, a 750 nm, e contabilizava-se o número de células presentes em cada frasco. Por diferença obtinha-se o crescimento da biomassa algácea em cada frasco e calculava-se uma média para cada concentração. Com o auxílio do

programa ICp calculou-se a percentagem de redução do crescimento da biomassa em relação ao controle. Os resultados foram expressos como CI25 (concentração de inibição em 25%), que é traduzido pela redução em 25% do crescimento da biomassa algácea em relação ao controle, em 96 horas de exposição ao agente tóxico. Também foram calculados os valores de CENO, CEO e o valor crônico (VC) dos efluentes pelo método de Dunnett.

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 – Análises físico-químicas

5.1.1 – Água de cultivo

A Tabela 4 apresenta os resultados da determinação dos parâmetros físico-químicos (média mensal dos parâmetros) da água de cultivo antes (meio inicial) e após (meio final) a realização dos testes, dados os quais são de suma importância para a validação dos testes e para o controle laboratorial. Foram monitorados os parâmetros oxigênio dissolvido (OD em mg/L), condutividade (em $\mu\text{S/cm}$), pH, temperatura (em $^{\circ}\text{C}$) e dureza total (em mg/L de CaCO_3).

Tabela 6 – Parâmetros físico-químicos do meio de cultivo dos microcrustáceos

| Organismo: <i>Daphnia similis</i> | | | | | | | | | |
|-----------------------------------|-------------------------|-------|-----|------|--------|-----------------------|-------|-----|------|
| | Meio de cultivo inicial | | | | | Meio de cultivo final | | | |
| | OD | Cond | pH | Temp | Dureza | OD | Cond | pH | Temp |
| Abril | 7,0 | 172,7 | 7,2 | 23,6 | 48 | 7,9 | 149,9 | 7,7 | 23,4 |
| Mai | 7,6 | 140,6 | 7,1 | 21,4 | 49 | 5,3 | 147,1 | 7,5 | 22,3 |
| Junho | 8,0 | F | 7,1 | 22,0 | 54 | 5,5 | F | 7,7 | 21,8 |
| Julho | 7,9 | 131,7 | 7,0 | 21,2 | 50 | 6,2 | 140,8 | 7,6 | 21,5 |
| Agosto | 7,7 | 122,2 | 7,0 | 22,3 | 51 | 7,4 | 138,7 | 7,6 | 22,7 |
| Setembro | 7,5 | 124,8 | 7,1 | 23,0 | F | 6,3 | 132,0 | 7,7 | 23,0 |

| Organismo: <i>Ceriodaphnia dubia</i> | | | | | | | | | |
|--------------------------------------|-------------------------|-------|-----|------|--------|-----------------------|-------|-----|------|
| | Meio de cultivo inicial | | | | | Meio de cultivo final | | | |
| | OD | Cond | pH | Temp | Dureza | OD | Cond | pH | Temp |
| Abril | 7,4 | 154,7 | 7,2 | F | 48 | 7,4 | 157,6 | 7,4 | 23,5 |
| Mai | 7,4 | 140,6 | 7,1 | 23,3 | 49 | 5,1 | 143,5 | 7,5 | 23,3 |
| Junho | 8,0 | F | 7,1 | 22,0 | 54 | 5,5 | F | 7,7 | 22,0 |
| Julho | 7,9 | 131,7 | 7,0 | 21,2 | 50 | 6,4 | 127,3 | 7,6 | 21,5 |
| Agosto | 7,7 | 122,2 | 7,0 | 22,3 | 51 | 7,5 | 134,2 | 7,7 | 22,9 |
| Setembro | 7,5 | 124,8 | 7,1 | 23 | F | 6,8 | 132,0 | 7,7 | 23,1 |

F: Falha na medição do parâmetro (falta de reagentes ou aparelho para medição)

Os resultados encontrados mostram algumas variações nestes parâmetros. Contudo, estas variações não interferiram nos testes uma vez que estão dentro das faixas toleráveis de variação segundo a norma, apresentadas pela Tabela 5.

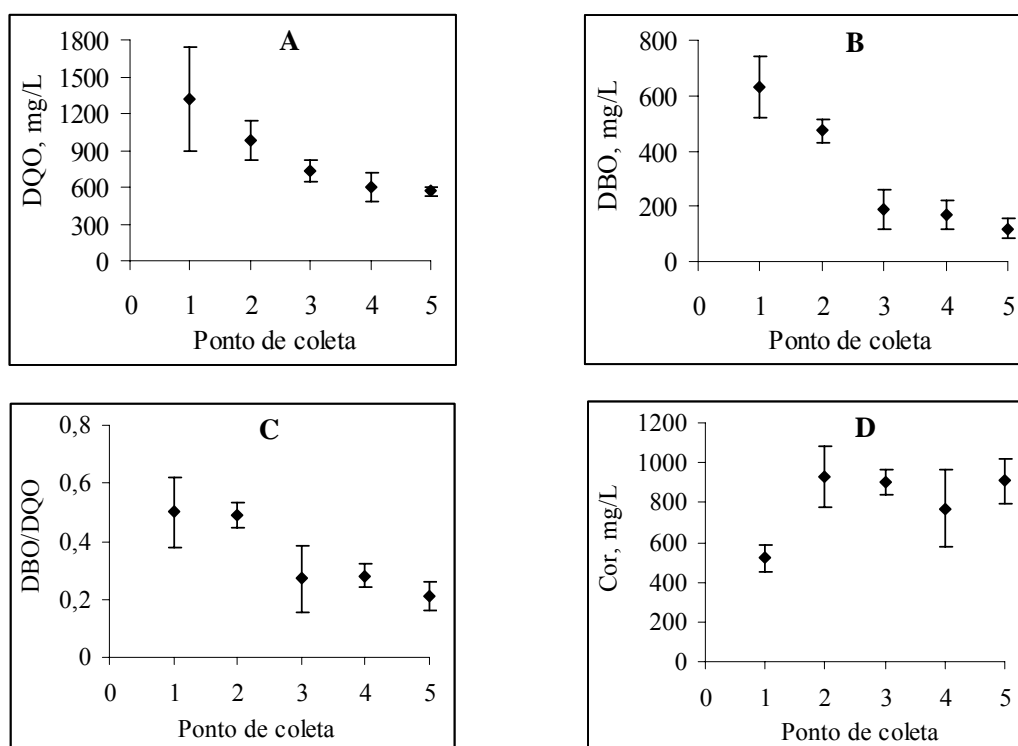
Tabela 7 – Faixas toleráveis de variação dos parâmetros físico-químicos

| Parâmetro de controle | Faixa tolerável de variação |
|-----------------------|-----------------------------|
| OD | Acima de 5 mg/L* |
| Dureza | Entre 40 e 48 mg/L |
| Condutividade | Entre 120 e 180 μ S/cm |
| Temperatura | Entre 21 e 25°C** |
| pH | Em torno de 7*** |

*Após a realização do teste ou troca de meio **Considerando-se a faixa para o cultivo dos microcrustáceos *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia dubia* ***Deve-se observar as variações bruscas de pH (<6,5 e >8) pois estas podem interferir nos resultados.

5.1.2 – Amostras

Os resultados das análises físico-químicas das amostras dos cinco pontos de coleta (Quadro 1) estão apresentados na Figura 6. (Os resultados experimentais para cada coleta e cada ponto de amostragem encontram-se no ANEXO A).



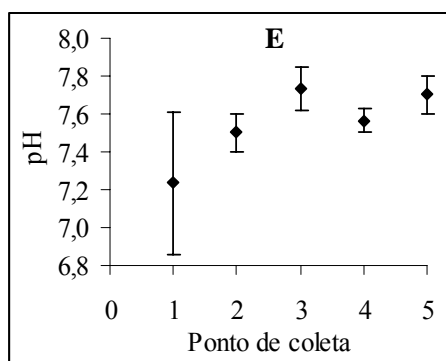


Figura 6 – Qualidade dos efluentes da entrada da lagoa aerada (P1) à saída da lagoa de polimento (P5) do sistema de tratamento da Suzano - Mucuri (valores médios \pm um desvio padrão, n=3). A: DQO; B: DBO; C: relação DBO/DQO; D: cor; e E: pH.

As eficiências de remoção de DQO, DBO e cor ao longo do sistema de tratamento estão apresentadas na Tabela 6.

Tabela 8 – Eficiência de remoção da matéria orgânica (DQO, DBO e cor) ao longo do sistema de tratamento de efluentes da Suzano-Mucuri

| Etapa ¹ | Eficiência de remoção, % | | | | | |
|--------------------|--------------------------|--------------------|-------|--------------------|-------|--------------------|
| | DQO | | DBO | | Cor | |
| | Média | dp, % ² | Média | dp, % ² | Média | dp, % ² |
| P1 → P2 | 22,7 | 14,3 | 24,3 | 6,6 | -77,6 | 7,9 |
| P2 → P3 | 25,0 | 6,8 | 59,8 | 14,2 | 1,8 | 16,9 |
| P3 → P4 | 18,0 | 10,5 | -5,6 | 72,2 | 14,6 | 17,2 |
| P4 → P5 | 3,9 | 14,5 | 28,0 | 18,1 | -23,3 | 38,3 |
| P1 → P5 | 54,5 | 11,5 | 81,2 | 2,6 | -77,1 | 41,3 |

¹ P1 = Entrada da lagoa aerada; P2 = Ponto intermediário da lagoa aerada; P3 = Entrada do MBBR; P4 = Saída do MBBR; P5 = Saída do sistema

² Desvio padrão (n=3)

A Figura 6 mostra que para as diferentes coletas realizadas tem-se uma variabilidade nos valores encontrados para os parâmetros físico-químicos, principalmente nos valores de entrada no sistema de tratamento. Contudo, quando se observa os valores encontrados na saída do tratamento pode-se constatar que o sistema de tratamento suporta estas variações das características dos parâmetros de entrada. Porém, deve-se ressaltar que em algum momento o sistema de tratamento pode não mais suportar estas variações e que, portanto é importante tentar de alguma forma amenizar estas variações para prevenir sobrecargas e perdas de eficiência no tratamento do efluente.

A Tabela 6 mostra uma remoção de DBO de aproximadamente 81%. Esta remoção não é muito alta uma vez que existem dois processos biológicos no sistema de tratamento de efluentes da indústria (lagoas aeradas e MBBR). A remoção de DQO é de apenas 54% e tal fato não é estranho, pois uma fração da DQO é a DBO e a remoção destes parâmetros está, portanto, interligada. Quando se avalia a relação DBO/DQO na saída do tratamento, que é em média 0,21, confirma-se que neste efluente estão presentes de compostos recalcitrantes, os quais não são facilmente degradados nos processos biológicos de tratamento.

O emprego do sistema MBBR auxilia na remoção de matéria orgânica, mas no que diz respeito à fração recalcitrante este processo não é tão eficiente, considerando os resultados desta pesquisa. Talvez fosse necessário estudar uma alternativa tecnológica que envolva processos físico-químicos de remoção desta DQO a fim de melhorar a qualidade do efluente tratado, ou ainda investir mais no controle operacional do sistema de tratamento existente visando a melhoria da eficiência de remoção da matéria orgânica biodegradável ainda presente no efluente tratado.

A escolha de tecnologias de tratamento avançado ou complementar de efluentes deve sempre levar em consideração os objetivos a serem alcançados, de forma que os poluentes sejam removidos de forma mais eficiente. A utilização de dois sistemas biológicos de tratamento (lagoa aerada e MBBR) não demonstra ser uma alternativa tão interessante dada a recalcitrância intrínseca dos efluentes de indústrias de celulose branqueada de eucalipto. Além disso, a matéria orgânica recalcitrante que permanece no efluente tratado pode ser a principal responsável pelos efeitos tóxicos causados aos organismos aquáticos (KOSTAMO E KUKKONEN, 2003).

A Figura 6D mostra que não há remoção alguma de cor para este sistema de tratamento adotado, o que é fato já conhecido, visto que os compostos responsáveis pela coloração dos efluentes de papel e celulose são de difícil remoção (SPRINGER, 1999). Ainda observa-se quanto a este parâmetro um aumento em seu valor (apontado também pelos valores negativos de eficiência de remoção na Tabela 6), o que pode estar associado aos subprodutos da biodegradação do efluente ou mesmo dos metabólitos e excreções dos microrganismos presentes em sistemas biológicos de tratamento de efluentes.

Quanto ao pH, nota-se que os resultados encontrados para o efluente analisado atendem aos padrões de lançamento de efluentes (pH entre 6 a 9). O pH teve um pequeno aumento ao longo do tratamento o que é previsível em se tratando de sistemas

de tratamento por lagoas de estabilização. À medida que se avança no sistema de tratamento, a quantidade de matéria orgânica a ser degradada vai diminuindo, e proporcionalmente o crescimento e a reprodução dos microrganismos diminuem. Em lagoas de polimento, por exemplo, há uma grande influência das algas no que diz respeito ao pH do efluente em tratamento. A pequena profundidade das lagoas de polimento facilita a penetração dos raios solares e conseqüentemente ajuda no crescimento algáceo. As algas, através do processo de fotossíntese consomem o CO₂ presente e alteram o equilíbrio carbônico da água, fazendo aumentar o pH da água.

5.2 – Testes de toxicidade

5.2.1 – Avaliação da água de cultivo

Os resultados do teste de viabilidade estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 9 – Resultados do teste de viabilidade da água de um poço artesiano (Bairro Acamari), utilizando *Daphnia similis* como organismo-teste

| Repetição | Nº inicial de organismos | Nº final de organismos |
|-----------|--------------------------|------------------------|
| 1 | 10 | 10 |
| 2 | 10 | 10 |
| 3 | 10 | 10 |
| 4 | 10 | 10 |
| 5 | 10 | 9 |
| 6 | 10 | 10 |
| 7 | 10 | 10 |

De acordo com a norma L5018 da CETESB, a percentagem de organismos imóveis ou mortos não deve exceder 10%. Com os resultados aqui obtidos, conclui-se que a água do manancial mostrou-se viável para o cultivo dos microcrustáceos.

Os dados de dureza apresentados anteriormente na Tabela 4 mostraram que não seria necessário fazer ajustes de dureza. Os demais ajustes (OD, pH) foram feitos de acordo com o procedimento anteriormente descrito.

5.2.2 - Testes de sensibilidade

No período de abril a agosto foram feitos os testes de toxicidade aguda com *Daphnia similis*, e, neste mesmo período foram feitos nove testes de sensibilidade para este organismo com a substância de referência NaCl. Os resultados estão na Tabela 8.

Tabela 10 – Resultado dos testes de sensibilidade com *Daphnia similis*

| Organismo-teste: <i>Daphnia similis</i> | |
|--|------------------------|
| Subst.: NaCl (g/L) | |
| Data do teste | CL ₅₀ , 48h |
| 23/04/2008 | 2,40 |
| 15/05/2008 | 2,76 |
| 26/06/2008 | 2,88 |
| 03/07/2008 | 2,76 |
| 16/07/2008 | 2,79 |
| 26/07/2008 | 2,74 |
| 02/08/2008 | 3,33 |
| 07/08/2008 | 3,01 |
| 23/08/2008 | 3,02 |
| média | 2,85 |
| desvio padrão | 0,25 |
| CV* (%) | 8,93 |

* Coeficiente de variação = desvio padrão/média

A validação dos testes de toxicidade depende dos testes de sensibilidade. E com estes resultados podemos inferir que o organismo *Daphnia similis* mostrou-se sensível, apresentando um coeficiente de variação (CV) menor que 30%. Outra forma de expressar os resultados de sensibilidade é através da construção de cartas-controle. Para isso é necessária a realização de um número maior de testes de sensibilidade. Estas cartas foram construídas com os dados aqui obtidos apenas para demonstrar esta outra forma de apresentação destes resultados. Esta carta controle encontra-se no ANEXO B.

Para o organismo *Ceriodaphnia dubia*, seguiu-se o mesmo procedimento adotado para os testes de sensibilidade com *Daphnia similis*, com realização de sete testes. Os resultados estão na Tabela 9 e mostram que este organismo também se mostrou sensível, apresentando um coeficiente de variação inferior a 30%. As cartas controle para este organismo também se encontram no ANEXO B. Cabe ressaltar que para este organismo houve uma maior dificuldade na obtenção de resultados dos testes de sensibilidade. Por isso foram aqui reportados menos testes e também foram realizados menos testes de toxicidade, o que de alguma forma prejudicou a obtenção dos resultados ecotoxicológicos.

Tabela 11 – Resultado dos testes de sensibilidade com *Ceriodaphnia dubia*

| Organismo teste: <i>Ceriodaphnia dubia</i> | |
|---|------------------------|
| Subst.: NaCl (g/L) | |
| Data do teste | CL ₅₀ , 48h |
| 17/04/2008 | 1,83 |
| 23/04/2008 | 1,81 |
| 22/05/2008 | 2,09 |
| 31/07/2008 | 1,89 |
| 07/08/2008 | 1,96 |
| 28/08/2008 | 1,89 |
| 04/10/2008 | 2 |
| média | 1,92 |
| desvio padrão | 0,10 |
| CV* | 5,14 |

* Coeficiente de variação = desvio padrão/média

Quanto à sensibilidade para a alga *Pseudokirchneriella subcapitata* foram feitos três testes com a substância de referência CuSO₄. As concentrações utilizadas, em mg/L, foram de 0,03; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 e 0,5. Os resultados e dados experimentais e a curva padrão que relaciona concentração e absorbância 750 nm estão dispostos no ANEXO B. Para a discussão aqui neste tópico apenas serão reportados os valores de CI25 calculados pelo programa estatístico e que estão na Tabela 10.

Tabela 12 – CI25 e intervalo de confiança para os testes de sensibilidade com *Pseudokirchneriella subcapitata* à substância de referência CuSO₄

| Teste | CI25, mg CuSO ₄ /L |
|---------------|-------------------------------|
| 1 | 0,34 |
| 2 | 0,4 |
| 3 | 0,31 |
| Média | 0,35 |
| desvio padrão | 0,05 |
| CV* | 0,13 |

* Coeficiente de variação = desvio padrão/média

Os testes mostram valores próximos de CI25 e coeficiente de variação inferior a 30%, e, portanto confirmam a sensibilidade deste organismo teste.

5.2.3 –Toxicidade das amostras de efluentes

Os resultados dos testes de toxicidade estão apresentados na Tabela 11. (Os resultados experimentais se encontram no ANEXO C). Não foi encontrada toxicidade aguda para a bactéria luminescente *Vibrio fischeri*. O efeito causado pela exposição da bactéria luminescente *Vibrio fischeri* ao efluente não superou os 50% em nenhuma das amostras de efluente bruto avaliadas. Sendo assim o programa computacional utilizado não pôde calcular a CE₅₀ para este organismo. O fato deste teste trabalhar com uma faixa de concentração menos ampla (0 a 45% do efluente) pode ter contribuído para o resultado encontrado. Uma alternativa seria refazer os testes concentrando as amostras de forma a obter um resultado mais abrangente.

Tabela 13 – Resultados dos testes de toxicidade de amostras de efluente coletado ao longo do sistema de tratamento da Suzano-Mucuri, para os organismos-teste utilizados

| Ponto | Data | Testes agudos | | Testes crônicos | | | | | | | |
|-------|----------|--|--|---------------------------|----------------------|---------|-------------|--|---------|---------|--------|
| | | <i>Vibrio fischeri</i> , CE ₅₀ , % | <i>Daphnia similis</i> , CL ₅₀ , % | <i>Ceriodaphnia dubia</i> | | | | <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> | | | |
| | | | | Sobrevivência | Reprodução | | Crescimento | | | | |
| | | | | | CE ₅₀ , % | CENO, % | CEO, % | VC, % | IC25, % | CENO, % | CEO, % |
| P1 | 19/05/08 | > 45 | >100 | 37,9 | 0 | 6,25 | - | NC | 50 | 75 | 61* |
| | 07/07/08 | > 45 | 69 | Na | na | na | na | 51,5 | 12,5 | 25 | 18** |
| | 07/08/08 | > 45 | >100 | Na | na | na | na | NC | 75 | 100 | 87* |
| P2 | 19/05/08 | na | >100 | Na | 50 | 100 | 70,7 | na | na | na | na |
| | 07/07/08 | na | >100 | Na | na | na | na | na | na | na | na |
| | 07/08/08 | na | >100 | Na | na | na | na | na | na | na | na |
| P3 | 19/05/08 | na | >100 | Na | 50 | 100 | 70,7 | na | na | na | na |
| | 07/07/08 | na | >100 | Na | na | na | na | na | na | na | na |
| | 07/08/08 | na | >100 | Na | na | na | na | na | na | na | na |
| P4 | 19/05/08 | na | >100 | 75,8 | 50 | 100 | 70,7 | na | na | na | na |
| | 07/07/08 | na | >100 | Na | na | na | na | na | na | na | na |
| | 07/08/08 | na | >100 | Na | na | na | na | na | na | na | na |
| P5 | 19/05/08 | na | >100 | 73,5 | 50 | 100 | 70,7 | NC | 100 | - | - |
| | 07/07/08 | na | >100 | Na | na | na | na | NC | 100 | - | - |
| | 07/08/08 | na | >100 | Na | na | na | na | NC | 50 | 75 | 61* |

na = não analisado; NC = não calculado pelo programa computacional

* Estímulo ao crescimento das algas ** Inibição ao crescimento – efeito tóxico

Para os testes agudos com *Daphnia similis*, o efluente analisado não apresentou toxicidade no efluente bruto, salvo em uma das amostragens, na qual o ponto P1' (CL₅₀ = 69%) apresentou alguma toxicidade. Para os demais resultados não foi possível calcular as CL₅₀ e CE₅₀, pelo fato de não haver diferença significativa nos dados de mortalidade em relação ao controle e as demais concentrações.

Pode-se concluir que o efluente avaliado não apresentou toxicidade aguda, tanto à bactéria *Vibrio fischeri* quanto ao microcrustáceo *Daphnia similis*.

Os resultados dos testes com o organismo *Ceriodaphnia dubia* são referentes apenas à primeira coleta (19/05/2008), e, portanto, não podem ser considerados conclusivos para o efluente analisado. O laboratório de ecotoxicidade da UFV ainda não conseguiu condições ótimas de cultivo para este microcrustáceo, e, portanto, para o presente estudo, não foi possível obter os resultados desejados com a eficiência e rapidez necessárias. É importante ressaltar que mais pesquisas e análises devem ser feitas com este organismo teste devido à sensibilidade que o mesmo apresentou ao efluente analisado.

Os resultados apresentados na Tabela 6 apontam para uma remoção da toxicidade crônica ao longo do tratamento. Quanto ao efeito na sobrevivência do organismo *Ceriodaphnia dubia*, houve um aumento de 37,9% (P1 - Entrada) para 73,5% (P5 - Saída). Este aumento corresponde a uma remoção da toxicidade já que a concentração do efluente que causou efeito (CE₅₀) aumentou.

Os resultados mostram que para as concentrações mais elevadas do efluente, o efeito aos organismos é deletério e mesmo para o efluente tratado existe ainda toxicidade crônica presente no mesmo, fato também confirmado pela CE₅₀ na saída do tratamento de 73,5%. Entretanto, para as concentrações mais baixas o efeito em alguns casos é benéfico, e, principalmente nas concentrações intermediárias, este efeito é traduzido por um estímulo reprodutivo aos organismos. Este estímulo é facilmente percebido pelo número médio de neonatos por fêmea, que na concentração de 25% do efluente (por exemplo), exceto para o efluente bruto, foi maior em relação aos controles.

Com estes resultados pode-se inferir que a presença de nutrientes no efluente pode estimular o crescimento e a reprodução dos organismos. Todavia, uma exposição prolongada e concentrada deste efluente não traz benefício algum, pois mesmo com a presença dos nutrientes, o efeito tóxico, devido à presença de outras substâncias, sobrepõe este benefício.

Deve-se considerar que no lançamento do efluente no corpo receptor (Rio Mucuri) ainda haverá uma diluição do efluente, e é possível que, através da autodepuração do rio, esta toxicidade seja consumida.

Aplicando as fórmulas sugeridas pela Resolução da Secretaria do Meio Ambiente (SMA-3), podemos ainda calcular a diluição do efluente no corpo receptor (DER), que utiliza no cálculo a $Q_{7,10}$ (que para o Rio Mucuri é de $17 \text{ m}^3/\text{s}$) e a vazão do efluente ($5700 \text{ m}^3/\text{h}$). Fazendo as conversões necessárias chegamos a um valor de 8,52%. Para os valores de CE_{50} e CENO encontrados para *Ceriodaphnia dubia* tem-se que a prevenção dos efeitos crônicos ocorrerá quando a DER for menor que a CE_{50} dividida por 10 (7,35%) e/ou menor que a CENO dividida por 100 (0,5%). Através destes cálculos pode-se inferir que não haverá efeito tóxico crônico para este efluente se for levada em consideração a diluição que ocorre no corpo receptor.

Em um estudo, STENZEL *et al.* (1998), avaliaram a toxicidade, através do organismo *Ceriodaphnia dubia*, de produtos químicos freqüentemente utilizados na produção da celulose branqueada. Os resultados encontrados mostraram que alguns destes produtos, como o dióxido de cloro e o hipoclorito de sódio provocaram efeitos crônicos nestes organismos mesmo em pequenas concentrações.

GONÇALVES *et al.* (1999) encontraram resultados semelhantes quando avaliou a toxicidade do efluente proveniente de cada etapa do branqueamento da celulose. Os autores encontraram toxicidade crônica no efluente proveniente da seqüência ECF devido à presença de residuais de dióxido de cloro. Também para a seqüência TCF encontrou-se toxicidade crônica para *Ceriodaphnia dubia*, especificamente para o estágio que utilizava o peróxido de hidrogênio. No estágio onde se empregava a ozonização a toxicidade foi a menor encontrada.

Como foi dito anteriormente, foram realizados poucos testes com o cladócero *Ceriodaphnia dubia*. Outras pesquisas como essas citadas têm encontrado toxicidade crônica para efluentes de fábricas de celulose e, portanto, é importante que se façam mais investigações a respeito do efluente aqui estudado, buscando identificar os compostos específicos responsáveis pela toxicidade.

Os testes de toxicidade à alga *Pseudokirchneriella subcapitata* foram realizados apenas no efluente na entrada da lagoa aerada (P1) e na saída do sistema (P5). Encontrou-se toxicidade crônica à alga apenas no efluente de entrada da segunda coleta (P1'), toxicidade esta que está representada pelos valores de $IC_{25} = 51,5\%$ e $VC = 18\%$.

Isto pode estar relacionado com a toxicidade aguda encontrada para esta mesma amostra no teste com *Daphnia similis*.

Em alguns casos, houve um maior crescimento algáceo em determinadas concentrações do efluente em relação ao controle, apontando para um estímulo de crescimento da alga na presença do efluente, o que pôde ser notado também para os testes com *Ceriodaphnia dubia*. Os valores encontrados de CENO, CEO e VC para a alga, apresentados na Tabela 6, confirmam esta afirmativa, através do valor encontrado para o VC de 87% para o ponto P1”. Deve-se lembrar que este valor está associado a um efeito não tóxico, mas de estímulo ao crescimento.

Com relação à saída do tratamento (P5), não se detectou toxicidade crônica à alga, o que era de se esperar uma vez que não se observou essa toxicidade nas amostras de entrada do sistema. Apenas em um dos pontos pôde-se calcular o VC (P5” = 61%), mostrando que também para o efluente tratado pode ocorrer este estímulo ao crescimento da alga.

Os resultados encontrados para o organismo-teste *Pseudokirchneriella subcapitata* podem ser atribuídos ao fato da presença de nutrientes em efluentes de celulose o que estimularia o crescimento das algas. Tal estímulo, quando excessivo, pode ser prejudicial aos corpos hídricos, pois caso haja um crescimento populacional exagerado destas algas, esbarra-se no problema da eutrofização que contribui para a degradação da qualidade da água dos mananciais.

Este resultado encontrado para a alga é semelhante ao encontrado por SPONZA (2003), que utilizou como organismo teste a alga *Chlorella sp.* e encontrou efeitos variados como inibição ao crescimento, mortalidade e até mesmo estímulo ao crescimento das algas.

A variabilidade das respostas obtidas para cada organismo-teste revela a importância de se utilizar organismos dos diferentes níveis tróficos nos ecossistemas aquáticos na avaliação ecotoxicológica de qualquer efluente ou substância. Desta forma podem-se diagnosticar melhor os problemas e planejar com mais segurança as ações preventivas e corretivas necessárias à remoção/eliminação da toxicidade.

Ademais, é importante avaliar, não só para esta tipologia industrial, os insumos e produtos químicos empregados no processo produtivo de forma a prever a presença e a formação de compostos os quais são conhecidos por serem potencialmente tóxicos, e, além disso, estudar as tecnologias e alternativas de tratamento necessárias à remoção de tais compostos.

As indústrias hoje devem se adequar às exigências legais no que diz respeito ao monitoramento ecotoxicológico de seus resíduos, com um intuito que deve ir além da isenção de multas e da obtenção de certificados de qualidade ambiental, mas também com o objetivo genuíno de promover a qualidade ambiental para as gerações presente e futura.

6 – CONCLUSÕES

A avaliação ecotoxicológica feita por meio desta pesquisa permitiu a elaboração de um diagnóstico da toxicidade dos efluentes das indústrias celulose branqueada de eucalipto.

- ✓ A eficiência do sistema de tratamento da Suzano-Mucuri foi suficiente para alcançar a remoção necessária para os diversos parâmetros de controle de lançamento de efluentes no Rio Mucuri, inclusive os parâmetros ecotoxicológicos.
- ✓ Os resultados das análises físico-químicas mostram, para a amostragem feita para este estudo, uma ineficiência na remoção da matéria orgânica através do tratamento biológico, uma vez que a tecnologia de tratamento adotada pela fábrica é conhecida por sua alta eficiência de remoção de matéria orgânica (> 90% para DBO e >70% para DQO). Os níveis de remoção encontrados não atingiram este padrão ideal.
- ✓ O efluente estudado não apresentou efeito tóxico agudo, exceto em uma amostra coletada na entrada da lagoa aerada. Esta exceção deve ser um motivo de preocupação no sentido de que seja feito um constante monitoramento das características do efluente tratado de forma a evitar possíveis aportes de cargas tóxicas ao corpo receptor, mesmo que isso ocorra esporadicamente.
- ✓ Encontraram-se efeitos tóxicos crônicos para este tipo de efluente, contudo ao considerar-se a diluição do efluente no corpo receptor, este efeito desaparece. É recomendável que outros estudos que avaliem os efeitos tóxicos crônicos sejam feitos uma vez que os resultados aqui encontrados partem de uma única coleta de amostras, e, neste caso, devem ser tratados como preliminares. Para a alga *Pseudokirchneriella subcapitata* os efeitos crônicos encontrados foram diferentes, uma vez que houve um estímulo ao crescimento das algas na maioria dos casos, quando expostos ao efluente bruto ou tratado. Este estímulo não pode ser considerado apenas benéfico pois quando se tem um crescimento excessivo da população das algas em um determinado corpo hídrico, contribui-se para a eutrofização deste manancial.

7 – SUGESTÕES PARA ESTUDOS FUTUROS

A partir dos resultados obtidos e das conclusões deste estudo podem-se fazer algumas recomendações para estudos futuros:

- ✓ Buscar alternativas para o tratamento dos efluentes das fábricas de celulose as quais contemplem não só estudos da remoção da carga orgânica dos efluentes, mas que englobem a remoção toxicidade;
- ✓ Avaliar mais precisamente os efeitos crônicos do efluente estudado utilizando também outros organismos aquáticos e realizando, se possível, testes no corpo receptor para verificar se realmente a diluição/dispersão do efluente pode ser suficiente para suprimir o efeito tóxico;
- ✓ Estudar a toxicidade específica dos compostos presentes nos efluentes de fábricas de celulose, a remoção destes compostos ao longo do tratamento, e os efeitos de sinergismo existentes entre estes compostos;
- ✓ Promover estudos na fauna, flora e no sedimento do corpo hídrico receptor de forma a avaliar os possíveis impactos causados pelas descargas destes efluentes.

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, W.J. Aquatic toxicology testing methods. In: HOFFMAN, D.J.; RATTNER, B.A.; BURTON Jr., G.A.; CAIRNS Jr., J. (eds.) **Handbook of Ecotoxicology**. Boca Raton. Lewis Publishers. London, 1995.
- ALI, M.; SREEKRISHNAN, T. R. Aquatic toxicity from pulp and paper mill effluents: a review. **Advances in Environmental Research**. v.5. p. 175-196, 2001.
- ALLAN, J.D. **Lifeshistory patterns in zooplankton**. The American Naturalist, v.110, n.971. p.165-180.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12713: Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade Aguda – Método de Ensaio com *Daphnia spp* (Cladocera, Crustácea)**. Rio de Janeiro: 2004.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 13373: Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade Crônica – Método de Ensaio com *Ceriodaphnia sp* (Cladocera, Crustácea)**. Rio de Janeiro: 2003.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12648: Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade Crônica – Método de Ensaio com algas (*Chlorophyceae*)**. Rio de Janeiro: 2004.
- APHA – AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION – **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. Washington: APHA, AWWA, WEF. 20.ed., 1998.
- AZEVEDO, F. A. de; CHASIN, A. A. M., **As Bases Toxicológicas da Ecotoxicologia**. São Paulo. RiMa, 2003. São Paulo: InterTox, 2003.
- BAIG, S.; LIECHTI, P.A. Ozone treatment for biorefractory COD removal. **Water Science Technology**. v.43. p.197–204, 2001.
- BIANCONI, C. **Brasil sobe para o 6º lugar para produção de celulose**. [online]. Disponível em Internet via WWW. URL: <http://www.celuloseonline.com.br/pagina/pagina.asp?IDItem=13386&IDNoticia=10953> Arquivo consultado em 09 de janeiro de 2007.

- BRASIL. **Lei Federal n. 9433, de 08 de janeiro de 1997.** Institui a política nacional de recursos hídricos, cria o sistema nacional de gerenciamento de recursos hídricos, regulamenta o inciso XIX do art. 21 da Constituição Federal, e altera o art. 1º da Lei n. 8001 de março de 1990, que modificou a Lei n. 7990 de 28 de dezembro de 1989. *Diário Oficial*. Brasília, 08 jan. 1997.
- BRASIL DAS ÁGUAS. **Projeto Brasil das águas.** Disponível em internet via WWW. URL: <http://www.hiparc.com.br/website/bdav2/viewer.htm>. Site acessado no dia 05/10/08.
- BURTON, G.L.; MACPHERSON, C. Sediment toxicity testing issues and methods. In: HOFFMAN, D.J.; RATTNER, B.A.; BURTON Jr., G.A.; CAIRNS Jr., J. (eds.) **Handbook of Ecotoxicology**. Boca Raton. Lewis Publishers. London, 1995.
- CAIRNS, J. Jr.; NIEDERLEHNER, B.R. **Ecological Toxicity Testing**. Boca Raton: Lewis Publishers. 228p.1995.
- CAPIZZI, T.; OPPENHELMER, L.; MEHTA, H.; NAIMIE, H. Statistical considerations in the evaluation of chronic aquatic toxicity studies. **Environmental Science and Technology**, v.19. p.35-43, 1985
- CENIBRA – Celulose Nipo Brasileira. **Processo de Produção de Celulose**. Disponível em internet via WWW. URL: <http://www.cenibra.com.br/> Arquivo consultado em 12 de julho de 2007.
- CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo. **Teste de toxicidade com *Chlorella vulgaris*. Método de ensaio**. L5.019, 1991.
- CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo. **Avaliação de toxicidade crônica, utilizando *Ceriodaphnia dubia* Richard, 1894 (Cladocera, Crustácea). Método de Ensaio**. L5.022, 1991
- CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo. **Teste de toxicidade aguda com *Daphnia similis* Claus, 1876 (Cladocera, Crustácea). Método de Ensaio**. L5.018, 1994.
- CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo. **Métodos de avaliação da toxicidade de poluentes a organismos aquáticos**. vol.1, São Paulo, 1999.

- CONAMA - CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. **Resolução CONAMA N° 357, de 17 de março de 2005.** Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Brasília: Diário Oficial da União, 18.03.2005
- COPAM - CONSELHO ESTADUAL DE POLÍTICA AMBIENTAL. CERH-MG - CONSELHO ESTADUAL DE RECURSOS HÍDRICOS DO ESTADO DE MINAS GERAIS. **Deliberação Normativa Conjunta COPAM/CERH-MG N.º 1, de 05 de Maio de 2008.** 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. Belo Horizonte: Diário do Executivo – “Minas Gerais” – 13/05/2008.
- CZECH, P.; WEBER, K.; DIETRICH, D.R. Effects of endocrine modulating substances on reproduction in the hermaphroditic snail *Lymnaea stagnalis* L. **Aquatic Toxicology.** v.53. p.103–114, 2000.
- DAS, B.S.; REID, S.G.; BETTS, J.L.; PATRICK, K. Tetrachloro-obenzoquinone as a component in bleached kraft chlorination effluent toxic to young salmon, J. Fish. **Research Board Canada.** v.26. p.3055–3067, 1969.
- ENVIRONMENT CANADA. **Guidance document on control of toxicity test precision using reference toxicants.** Report EPS 1/RM/12. 85 p, 1990.
- ENVIRONMENT CANADA. **Biological test methods: test of reproduction and survival using the cladoceran *Ceriodaphnia dubia*.** Report EPS 1/RM/21. Environment Canada, Conservation and Protection, Ottawa, Ontario. 72p, 1992a.
- FUNDAÇÃO DO MEIO AMBIENTE DE SANTA CATARINA - FATMA. **Portaria n° 017/02 de 18 de abril de 2002.** Limites Máximos de Toxicidade Aguda para Efluentes de Diferentes Origens. Florianópolis: FATMA, 2002.
- FRACÁCIO, R. **Estudos limnológicos e ecotoxicológicos (laboratoriais e *in situ*), com ênfase na avaliação de toxicidade de metais e de pesticidas organoclorados em peixes (*Danio rerio* e *Poecilia reticulata*) – Sub-bacia do rio Monjolinho.** 2006. 209p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) Universidade Federal de São Carlos. UFSCar, 2006.

- GELBER, R.D.; LAVIN, P.T.; MEHTA, C.R.; SCHOENFELD, D.A. Statistical Analysis. In: **Fundamentals of Aquatic Toxicology**. G.M. Rand e S.R. Petrocelli (eds). pp.110-123, 1985
- GILMAN, C.I.; LEUSCH, F.D.L.; BRECKENRIDGE, W.C.; MacLATCHY, D.L. Effects of a phytosterol mixture on male fish plasma lipoprotein fractions and testis P450_{scc} activity. **General and Comparative Endocrinology**. n.130 p.172–184, 2003.
- GONÇALVES, S.M.; HENRIQUES, J.A.P.; FOELKEL, C. Avaliação ecotoxicológica e mutagênica de efluentes gerados no branqueamento da celulose. In: 32º Congresso Anual de Celulose e Papel, 1999, Santa Maria – RS. **Anais...** Santa Maria: 1999.
- GRADVOHL, **Avaliação dos riscos ambientais e ecotoxicológicos do reuso de águas residuárias em piscicultura**. 2006. 164p. Dissertação (Mestrado em Saneamento Ambiental). Universidade Federal do Ceará. UFC, 2006.
- HEWITT, L.M.; MARVIN, C.H. Analytical methods in environmental effects-directed investigations of effluents. **Mutation Research**. n.589. p.208–232, 2005
- HOFFMAN, D.J.; RATTNER, B.A.; BURTON Jr., G.A.; CAIRNS Jr., J. (eds.) **Handbook of Ecotoxicology**. Boca Raton. Lewis Publishers. London, 1995.
- INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE. **Manual do IBAMA Parte D - Avaliação da toxicidade de agentes químicos para microrganismos, microcrustáceos, peixes, algas, organismos do solo, aves animais silvestres e plantas**. IBAMA, 1987.
- INSTITUTO MINEIRO DE GESTÃO DAS ÁGUAS. Disponível em Internet via WWW. URL: http://www.igam.mg.gov.br/index.php?option=com_content&task=view&id=158&Itemid=140. **IGAM, 2008**. Acessado em agosto de 2008.
- JORDÃO, E.P. **Tecnologias de Tratamento de Esgoto Sanitário no Brasil: Situação Atual e Tendências Futuras**. Disponível em }Internet via WWW. URL: <http://www.fenasan.com.br/encontrotecnico/palestras08/2008/09h00eduardopachecojordaoaud120-08.pdf> . São Paulo, 2008. Acessado em outubro de 2008.
- KNIE, J. L. W.; LOPES, E. W. B. **Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações**. Florianópolis: FATMA / GTZ, p. 289, 2004.

- KOSTAMO, A.; KUKKONEN, J.V.K. Removal of resin acids and sterols from pulp mill effluents by activated sludge treatment. **Water Research**. n.37. p.2813–2820, 2003.
- KOSTAMO, A.; HOLMBOM, B.; KUKKONEN, J.V.K. Fate of wood extractives in wastewater treatment plants at kraft pulp mills and mechanical pulp mills. **Water Research**. v.38. p.972–982, 2004.
- MELLO, P.S.; FABRIN NETO, J.B.; MORAES, S.G. de.; ASSALIN, M.R.; DURÁN, N.; HAUN, M. Comparative toxicity of effluents processed by different treatments in V79 fibroblasts and the Algae *Selenastrum capricornutum*. **Chemosphere**. v.62. p.1207–1213, 2006.
- METCALF, EDDY. **Wastewater Engineering: Treatment and reuse**. 4th Ed. Revisado por: George Tchobanoglous, Franklin L. Burton e H. David Stensel. New York, NY: McGraw-Hill, 2003. 1820p.
- MICROBICS CORPORATION. **Microtox Manual, A Toxicity Testing Handbook**. vol. 1–5. Microbics Corp., Carlsbad, CA, USA, 1992
- NIEMINEN, P.; MUSTONEN, A.M.; LINDSTRÖM-SEPPÄ, P.; ASIKAINEN, J.; MUSSALO-RAUHAMAA, H.; KUKKONEN, J.V.K. Phytosterols Act as Endocrine and Metabolic Disruptors in the European Polecat (*Mustela putorius*). **Toxicology and Applied Pharmacology**. n.178. p.22–28, 2002.
- NIEWEGLOWSKI, A. M. A.; SILVA, E. M. de F. M. da. Importância dos Parâmetros Ecotoxicológicos em Estudos Ambientais. In: **Manual de avaliação de impactos ambientais**, Curitiba: SUREHMA, 1999. p. 06.
- PAASIVIRTA, J. **Chemical Ecotoxicology**. Chelsea: Lewis Publishers, Inc., 210p, 1991.
- PAIVA, A. B. **Avaliação de risco ambiental utilizando parâmetros físico-químicos e biológicos no rio Canoas/SC**. 2004. 105p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) Universidade Federal de Santa Catarina. UFSC, 2004.
- PLAA, G. L. Present status: toxic substances in the environment. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 60, p.1010-1016, 1982.
- RAND, G.M.; PETROCELLI, S.R. **Fundamentals of aquatic toxicology: methods and application**. Hemisphere Publishing Corporation. London, 1985.

- SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE - SMA. **Resolução SMA-3, de 22 de fevereiro de 2000.** O Secretário do Meio Ambiente, em face da deliberação da Diretoria Plena da CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental que aprovou a necessidade de implementar o controle ecotoxicológico de efluentes líquidos no Estado de São Paulo. *Diário Oficial*, São Paulo, 25 fev. 2000. p. 24.
- SOBREIRA, R.G.; FURLEY, T.H.; EFFIGEN, J.I.; OLIVEIRA FILHO, A.C. de. Avaliação ecotoxicológica do ácido hexadecanóico e do β Sitosterol para *Daphnia similis* Claus 1876 (Cladocera, Crustacea). **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**. Vol. 1. n.2. 2006. p. 167-170
- SILVA, T.C.F. da. **Processos oxidativos avançados para tratamento de efluentes de indústria de celulose kraft branqueada.** 2007. 92p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) Universidade Federal de Viçosa. UFV, 2007.
- SLOOF, W. Introduction to Aquatic Toxicology. In: KRUIJF, H.A.M.; ZWART, D.; VISWANATHAN, P.N.; RAY, P.K. Eds. **Manual on Ecotoxicology**. 332p, 1988.
- SPONZA, D.T. Application of toxicity tests into discharges of the pulp-paper industry in Turkey. **Ecotoxicology and environmental safety**. n.54. 2003. p.74-86.
- SPRINGER, A.M. **Industrial environmental control** – pulp and paper industry, 2 ed. Atlanta: Tappi Press, 1999.
- STENZEL, L. FOELKEL, C. GALLARDO, V.R.B. Avaliação ecotoxicológica e da genotoxicidade de produtos químicos freqüentemente utilizados no processo de cozimento e branqueamento de celulose Kraft. 31º Congresso anual de celulose e papel da ABTCP, 1998. **Anais...** São Paulo: 1998.
- SUZANO PAPEL E CELULOSE. **Projeto Mucuri** [online]. Disponível em Internet via WWW. URL: http://www.suzano.com.br/projetomucuri/1_4.html. Arquivo consultado em 04 de julho de 2007.
- THOMPSON, G.; SWAIN, J.; KAY, M.; FORSTER, C.F. The treatment of pulp and paper mill effluent: A review. **Bioresource Technology**. v.77. p.275–286, 2001.
- TUNDISI, J.G. **Enfrentando a escassez da água.** São Paulo: Editora Rima, 2005.
- USEPA – United States Environmental Protection Agency. **Methods for aquatic toxicity identification evaluations. Office of research and development.** Washington DC 20460. 1991.

USEPA – United States Environmental Protection Agency. **Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms.** 5ª edição. Office of Water (4303T).1200 Pennsylvania Avenue, NW. Washington, DC 20460. 2002a.

USEPA – United States Environmental Protection Agency. **Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms.** 4ª edição. Office of Water (4303T).1200 Pennsylvania Avenue, NW. Washington, DC 20460. 2002b.

XAVIER, C.R.; BECERRA, J.; HERNÁNDEZ, V.; CHAMORRO, S.; VIDAL, G. Effects of phytosterols contained in pulp mill effluent on *D. magna* and *D. obtuse*. In: Sixth International Conference on Fate and Effects of Pulp and Paper Mill Effluents, 2006, Vitória. **Anais...** Vitória: 2006. CD-ROM.

ZAGATTO, P. A. **“Mini-curso: Ecotoxicologia Aquática”**. VII Congresso Brasileiro de Limnologia. Florianópolis, 2006.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações.** São Carlos. RiMa: 2006.

ANEXOS

Dados experimentais e resultados preliminares

ANEXO A – ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO EFLUENTE

Tabela A1 – Parâmetros físico-químicos analisados para o efluente da Suzano

| Pontos de amostragem | Relação DBO/DQO | | | | DQO (mg/L) | | | |
|-------------------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|-------|-----------------------|----------------------|----------------------|-------|
| | Coleta 1 19/5/2008 | Coleta 2 7/7/2008 | Coleta 3 7/8/2008 | Média | Coleta 1 19/5/2008 | Coleta 2 7/7/2008 | Coleta 3 7/8/2008 | Média |
| P1 | 0,36 | 0,59 | 0,55 | 0,50 | 1781 | 1242 | 929 | 1317 |
| P2 | 0,45 | 0,48 | 0,53 | 0,49 | 1083 | 1054 | 800 | 979 |
| P3 | 0,14 | 0,37 | 0,29 | 0,27 | 819 | 717 | 652 | 729 |
| P4 | 0,33 | 0,26 | 0,26 | 0,28 | 684 | 657 | 462 | 601 |
| P5 | 0,21 | 0,26 | 0,16 | 0,21 | 591 | 585 | 521 | 566 |
| Cor (uH) | | | | | DBO (mg/L) | | | |
| P1 | 577 | 543 | 447 | 522 | 640 | 733 | 513 | 629 |
| P2 | 1041 | 998 | 754 | 931 | 483 | 508 | 423 | 472 |
| P3 | 852 | 970 | 871 | 898 | 118 | 263 | 188 | 190 |
| P4 | 757 | 976 | 581 | 771 | 223 | 168 | 120 | 171 |
| P5 | 780 | 969 | 973 | 907 | 125 | 154 | 82 | 120 |
| Potencial Hidrogeniônico (pH) | | | | | | | | |
| P1 | 6,8 | 7,4 | 7,5 | 7,2 | | | | |
| P2 | 7,5 | 7,4 | 7,6 | 7,5 | | | | |
| P3 | 7,8 | 7,6 | 7,8 | 7,7 | | | | |
| P4 | 7,6 | 7,5 | 7,6 | 7,6 | | | | |
| P5 | 7,7 | 7,6 | 7,8 | 7,7 | | | | |

Tabela A2 – Dados físico-químicos de entrada e saída do sistema de tratamento fornecidos pela empresa

| Parâmetro | Entrada | Saída |
|-----------|---------|-------|
| DQO, mg/L | 1132 | 427 |
| DBO, mg/L | 312 | 30 |
| Cor, uH | 675 | 764 |
| AOX, mg/L | 4,10 | 1,90 |

ANEXO B – PREPARO DE SOLUÇÕES-TESTE E TESTES DE SENSIBILIDADE.

Tabela B1 – Volume de solução-estoque para preparo das soluções-teste com águas e efluentes utilizando o meio L.C. Oligo e amostra enriquecida

| Concentração da solução teste (%) | Volume de amostra enriquecida (mL) | Volume de meio de cultura (mL) | Volume final mL |
|-----------------------------------|------------------------------------|--------------------------------|-----------------|
| 100 | 100 | ----- | 100 |
| 75 | 75 | 25 | 100 |
| 50 | 50 | 50 | 100 |
| 25 | 25 | 75 | 100 |
| 12,5 | 12,5 | 87,5 | 100 |
| 6,25 | 6,2 | 93,8 | 100 |
| controle | ----- | 100 | 100 |

Notas:

- 1 - O volume de inóculo a ser adicionado deve estar entre 0,1 e 1 mL,
- 2 - A amostra deve ser enriquecida adicionando alíquotas das soluções do meio de cultura (oligo) nas mesmas proporções que se utilizam no preparo deste meio.

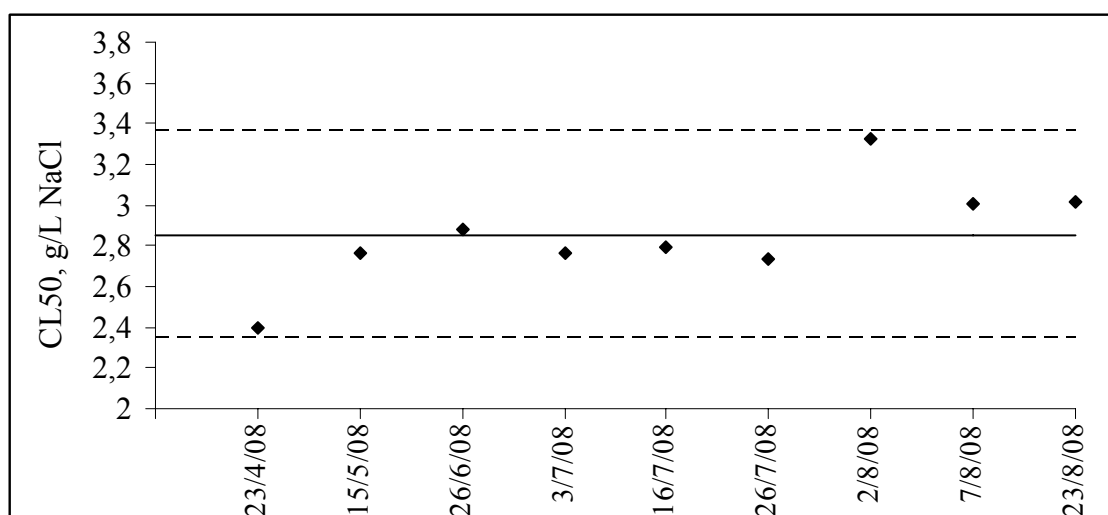


Figura B1 – Carta controle contendo os resultados dos testes de sensibilidade de *Daphnia similis* à substância de referência NaCl. (Linha cheia: média; linhas tracejadas: \pm dois desvios padrão, n =9).

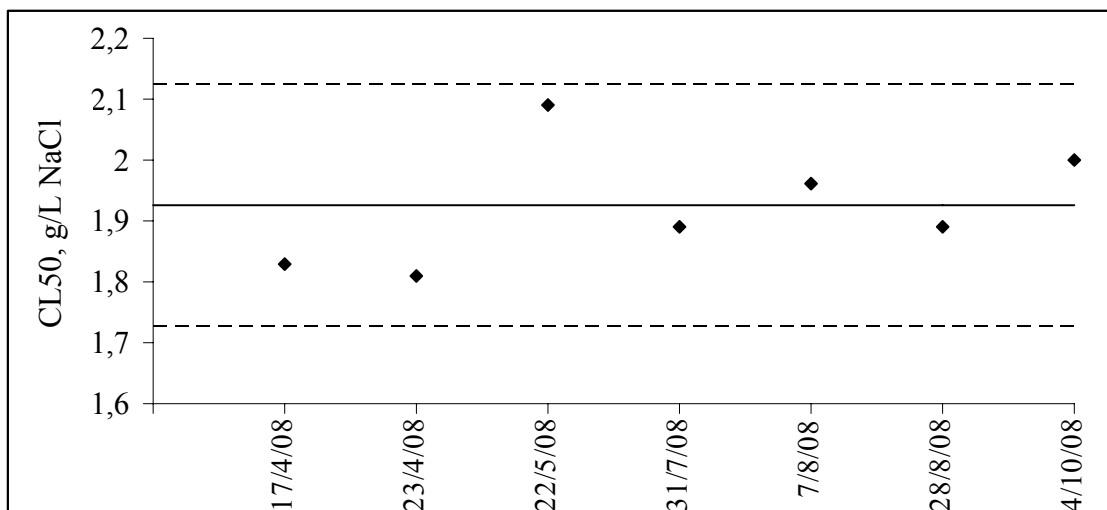


Figura B2 – Carta controle contendo os resultados dos testes de sensibilidade de *Ceriodaphnia dubia* à substância de referência NaCl. (Linha cheia: média; linhas tracejadas: \pm dois desvios padrão, $n = 7$).

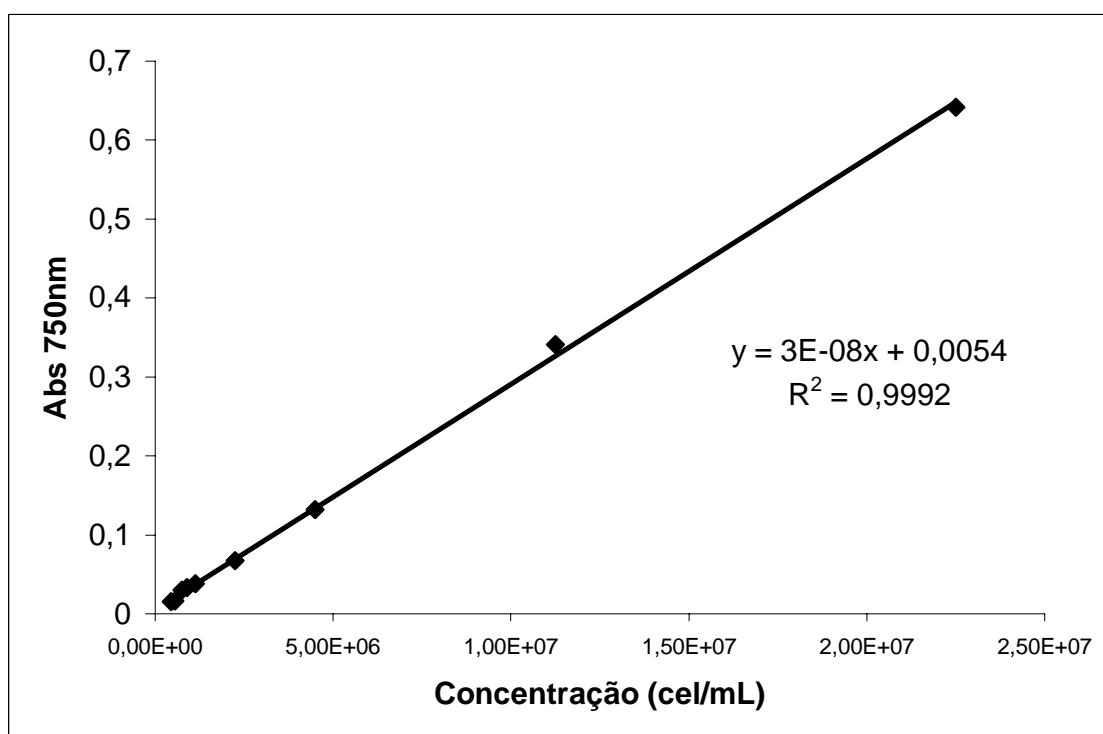


Figura B3 – Curva padrão para a alga *Pseudokirchneriella subcapitata* (Relação Concentração x Absorbância 750nm)

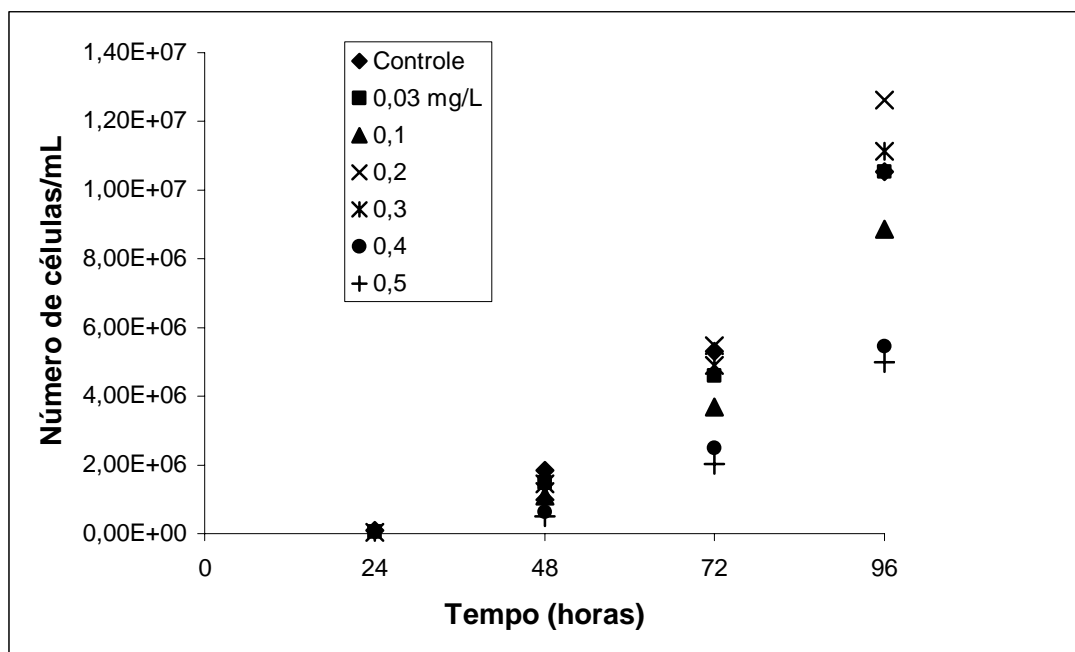


Figura B4 – Resultado do 1º teste de sensibilidade com *Pseudokirchneriella subcapitata*. Substância de referência: CuSO₄.

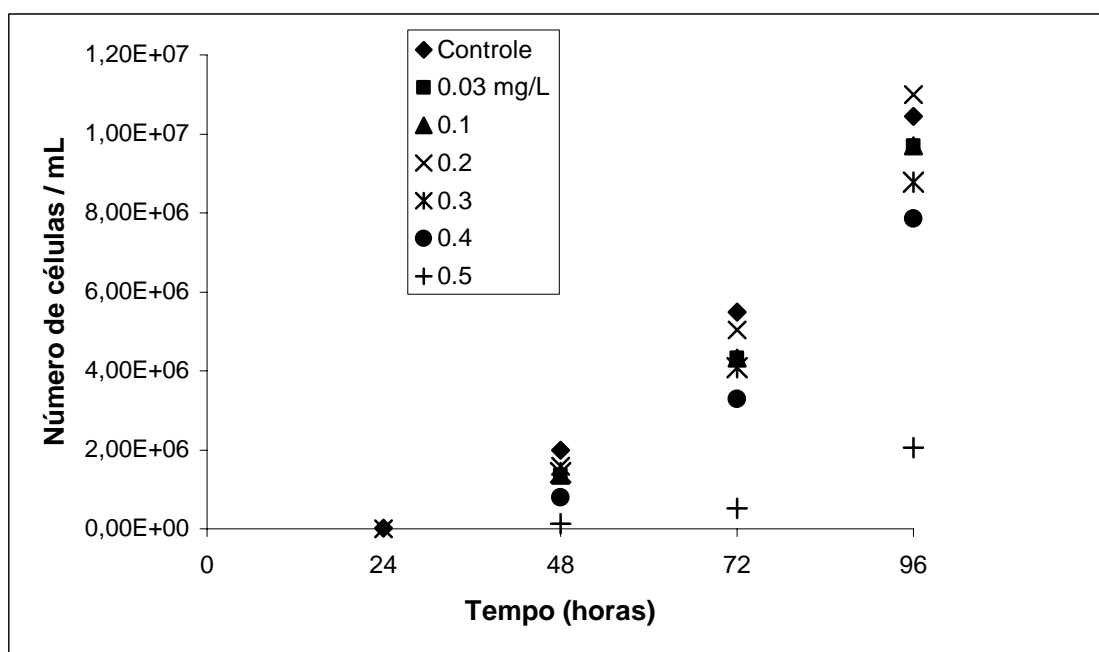


Figura B5– Resultado do 2º teste de sensibilidade com *Pseudokirchneriella subcapitata*. Substância de referência: CuSO₄.

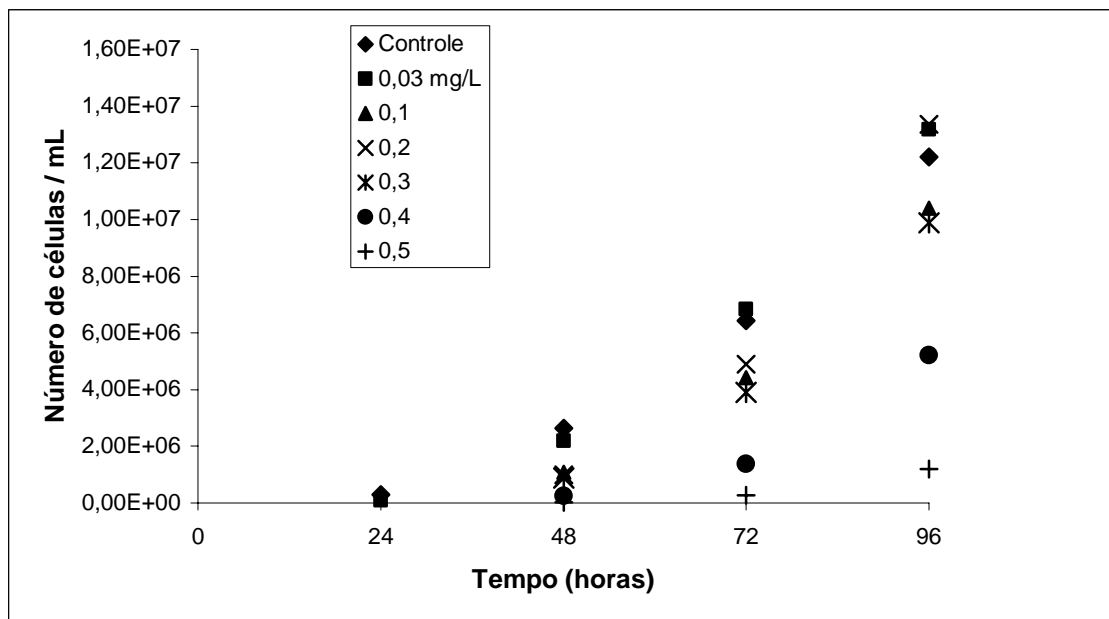


Figura B6 – Resultado do 3º teste de sensibilidade com a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. Substância de referência: CuSO₄.

ANEXO C – DADOS EXPERIMENTAIS DOS TESTES DE TOXICIDADE

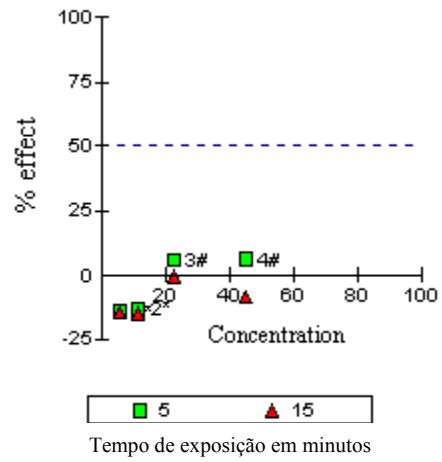
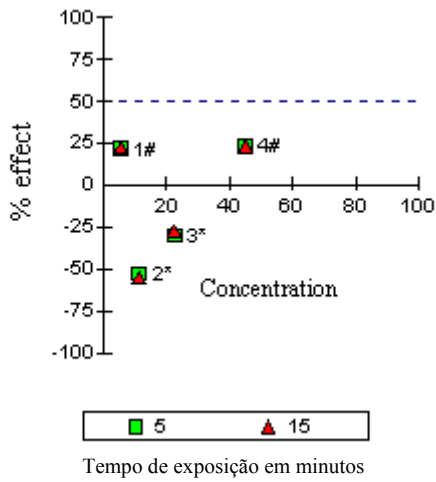


Figura C1 – Porcentagem de efeito causado à bactéria *Vibrio fischeri* exposta ao efluente. Amostra: P1

Figura C2 – Porcentagem de efeito causado à bactéria *Vibrio fischeri* exposta ao efluente. Amostra: P1'

1 : Concentração de 5% do efluente 2: 11% de efluente 3: 22% de efluente 4: 45% de efluente

Tabela C1 – Resultados experimentais dos testes de toxicidade com *Daphnia similis*

| TESTE PRELIMINAR | | | TESTE DEFINITIVO | | | | | | | | |
|---------------------|--------|-----------------|---------------------|--------|-----------------|----------------------|--------|-----------------|----------------------|--------|-----------------|
| P1 Coleta: 19/05/08 | | | P1 Coleta: 19/05/08 | | | P1' Coleta: 07/07/08 | | | P1'' Coleta 07/08/08 | | |
| Análise: 29/05 | | Mortos após 48h | Análise: 17/06 | | Mortos após 48h | Análise: 16/07 | | Mortos após 48h | Análise: 19/08 | | Mortos após 48h |
| Concentr. | Início | | Concentr. | Início | | Concentr. | Início | | Concentr. | Início | |
| Controle | 20 | 0 | Controle | 20 | 0 | Controle | 20 | 0 | Controle | 20 | 0 |
| 6,25% | 20 | 0 | 50% | 20 | 0 | 50% | 20 | 1 | 50% | 20 | 0 |
| 12,50% | 20 | 0 | 60% | 20 | 0 | 60% | 20 | 1 | 60% | 20 | 0 |
| 25% | 20 | 0 | 75% | 20 | 0 | 75% | 20 | 16 | 75% | 20 | 0 |
| 50% | 20 | 0 | 90% | 20 | 0 | 90% | 20 | 19 | 90% | 20 | 0 |
| 100% | 20 | 0 | 100% | 20 | 0 | 100% | 20 | 20 | 100% | 20 | 0 |
| P2 Coleta: 19/05/08 | | | P2 Coleta: 19/05/08 | | | P2' Coleta: 07/07/08 | | | P2'' Coleta 07/08/08 | | |
| Análise: 27/05 | | Mortos após 48h | Análise: 10/07 | | Mortos após 48h | Análise: 24/07 | | Mortos após 48h | Análise: 21/08 | | Mortos após 48h |
| Concentr. | Início | | Concentr. | Início | | Concentr. | Início | | Concentr. | Início | |
| Controle | 20 | 1 | Controle | 20 | 0 | Controle | 20 | 2 | Controle | 20 | 0 |
| 6,25% | 20 | 0 | 50% | 20 | 0 | 50% | 20 | 3 | 50% | 20 | 2 |
| 12,50% | 20 | 0 | 60% | 20 | 0 | 60% | 20 | 4 | 60% | 20 | 4 |
| 25% | 20 | 3 | 75% | 20 | 0 | 75% | 20 | 6 | 75% | 20 | 5 |
| 50% | 20 | 1 | 90% | 20 | 0 | 90% | 20 | 7 | 90% | 20 | 5 |
| 100% | 20 | 2 | 100% | 20 | 0 | 100% | 20 | 12 | 100% | 20 | 6 |
| P3 Coleta: 19/05/08 | | | P3 Coleta: 19/05/08 | | | P3' Coleta: 07/07/08 | | | P3'' Coleta 07/08/08 | | |
| Análise: 22/05 | | Mortos após 48h | Análise: 26/06 | | Mortos após 48h | Análise: 29/07 | | Mortos após 48h | Análise: 26/08 | | Mortos após 48h |
| Concentr. | Início | | Concentrações | Início | | Concentrações | Início | | Concentrações | Início | |
| Controle | 20 | 0 | Controle | 20 | 0 | Controle | 20 | 0 | Controle | 20 | 0 |
| 6,25% | 20 | 0 | 50% | 20 | 0 | 50% | 20 | 0 | 50% | 20 | 0 |
| 12,50% | 20 | 0 | 60% | 20 | 0 | 60% | 20 | 0 | 60% | 20 | 0 |
| 25% | 20 | 1 | 75% | 20 | 0 | 75% | 20 | 0 | 75% | 20 | 0 |
| 50% | 20 | 0 | 90% | 20 | 0 | 90% | 20 | 0 | 90% | 20 | 0 |
| 100% | 20 | 0 | 100% | 19 | 0 | 100% | 20 | 0 | 100% | 20 | 0 |
| P4 Coleta: 19/05/08 | | | P4 Coleta: 19/05/08 | | | P4' Coleta: 07/07/08 | | | P4'' Coleta 07/08/08 | | |
| Análise: 03/06 | | Mortos após 48h | Análise: 15/07 | | Mortos após 48h | Análise: 31/07 | | Mortos após 48h | Análise: 28/08 | | Mortos após 48h |
| Concentr. | Início | | Concentr. | Início | | Concentr. | Início | | Concentr. | Início | |
| Controle | 20 | 0 | Controle | 20 | 0 | Controle | 20 | 1 | Controle | 20 | 0 |
| 6,25% | 20 | 0 | 50% | 20 | 0 | 50% | 20 | 1 | 50% | 20 | 0 |
| 12,50% | 20 | 0 | 60% | 20 | 0 | 60% | 20 | 1 | 60% | 20 | 0 |
| 25% | 20 | 1 | 75% | 20 | 0 | 75% | 20 | 0 | 75% | 20 | 0 |
| 50% | 20 | 0 | 90% | 20 | 0 | 90% | 20 | 0 | 90% | 20 | 0 |
| 100% | 20 | 0 | 100% | 20 | 0 | 100% | 20 | 0 | 100% | 20 | 0 |
| P5 Coleta: 19/05/08 | | | P5 Coleta: 19/05/08 | | | P5' Coleta: 07/07/08 | | | P5'' Coleta 07/08/08 | | |
| Análise: 12/06 | | Mortos após 48h | Análise: 12/07 | | Mortos após 48h | Análise: 29/07 | | Mortos após 48h | Análise: 02/09 | | Mortos após 48h |
| Concentr. | Início | | Concentr. | Início | | Concentr. | Início | | Concentr. | Início | |
| Controle | 20 | 0 | Controle | 20 | 0 | 19 | 20 | 0 | Controle | 20 | 0 |
| 6,25% | 20 | 0 | 50% | 20 | 0 | 50% | 20 | 0 | 50% | 20 | 0 |
| 12,50% | 20 | 1 | 60% | 20 | 0 | 60% | 20 | 0 | 60% | 20 | 0 |
| 25% | 20 | 0 | 75% | 20 | 0 | 75% | 20 | 0 | 75% | 20 | 0 |
| 50% | 20 | 0 | 90% | 20 | 0 | 90% | 20 | 0 | 90% | 20 | 0 |
| 100% | 20 | 0 | 100% | 20 | 0 | 100% | 20 | 0 | 100% | 20 | 0 |

Tabela C2 – Resultados experimentais para o teste de toxicidade crônica com *Ceriodaphnia dubia* (com os dados de reprodução e sobrevivência)

| P1 | | | | | | | | | | | | P4 | | | | | | | | | | | |
|-----------|----------------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|---------------|-----------|----------------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|---------------|
| Concentr. | Repetição (n° de neonatos) | | | | | | | | | | Fêmea sobrev. | Concentr. | Repetição (n° de neonatos) | | | | | | | | | | Fêmea sobrev. |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | |
| Controle | 12 | 13 | 14 | 10 | 9 | 15 | 16 | 12 | 4 | 5 | 10 | Controle | 18 | 17 | 13 | 20 | 25 | 11 | 16 | 14 | 14 | 17 | 10 |
| 6,25% | 0 | | 3 | 1 | 9 | 9 | 1 | 7 | 8 | 11 | 9 | 6,25% | 20 | 17 | 19 | 20 | 24 | 21 | 24 | 22 | 24 | 18 | 10 |
| 12,50% | 7 | 0 | 4 | 1 | 10 | 3 | 4 | 8 | 2 | 4 | 10 | 12,50% | 14 | 15 | 22 | 15 | 26 | 23 | 23 | 21 | 4 | 21 | 9 |
| 25% | 7 | 15 | 6 | 0 | 10 | 8 | 0 | 1 | 11 | 16 | 9 | 25% | 23 | 8 | 20 | 28 | 21 | 22 | 19 | 19 | 7 | 23 | 10 |
| 50% | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 0 | 2 | 50% | 15 | 26 | 16 | 0 | 14 | 17 | 13 | 14 | 4 | 24 | 8 |
| 100% | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100% | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 | 0 | 0 | 3 |
| P2 | | | | | | | | | | | | P5 | | | | | | | | | | | |
| Concentr. | Repetição (n° de neonatos) | | | | | | | | | | Fêmea sobrev. | Concentr. | Repetição (n° de neonatos) | | | | | | | | | | Fêmea sobrev. |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | |
| Controle | 9 | 5 | 6 | 10 | 12 | 8 | 10 | 8 | 1 | 8 | 10 | Controle | 7 | 21 | 13 | 16 | 13 | 0 | 14 | 9 | 0 | 17 | 10 |
| 6,25% | 20 | | 15 | 0 | 0 | 13 | 0 | 14 | 10 | 0 | 5 | 6,25% | 5 | 10 | 11 | 19 | 5 | 13 | 24 | 18 | 19 | 14 | 10 |
| 12,50% | 12 | 0 | 20 | 23 | 17 | 25 | 18 | 17 | 0 | 22 | 8 | 12,50% | 25 | 21 | 28 | 15 | 20 | 14 | 24 | 15 | 20 | 22 | 10 |
| 25% | 19 | 18 | 14 | 26 | 17 | 15 | 14 | 16 | 21 | 22 | 10 | 25% | 23 | 21 | 14 | 22 | 28 | 31 | 12 | 25 | 19 | 18 | 10 |
| 50% | 11 | 12 | 8 | 11 | 12 | 13 | 12 | 10 | 2 | 16 | 10 | 50% | 13 | 19 | 15 | 0 | 16 | 17 | 11 | 15 | 18 | 18 | 10 |
| 100% | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 5 | 100% | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| P3 | | | | | | | | | | | | P1' | | | | | | | | | | | |
| Concentr. | Repetição (n° de neonatos) | | | | | | | | | | Fêmea sobrev. | Concentr. | Repetição (n° de neonatos) | | | | | | | | | | Fêmea sobrev. |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | |
| Controle | 6 | 8 | 11 | 9 | 0 | 7 | 0 | 10 | 8 | 13 | 9 | Controle | 0 | 21 | 0 | 15 | 13 | 0 | 17 | 20 | 13 | 9 | 10 |
| 6,25% | 4 | 16 | 16 | 16 | 20 | 23 | 20 | 14 | 12 | 0 | 10 | 6,25% | 19 | 25 | 16 | 30 | 23 | 30 | 24 | 9 | 25 | 29 | 10 |
| 12,50% | 3 | 14 | 13 | 4 | 19 | 20 | 21 | 17 | 20 | 12 | 10 | 12,50% | 10 | 0 | 14 | 21 | 19 | 16 | 15 | 4 | 15 | 17 | 10 |
| 25% | 5 | 16 | 17 | 18 | 18 | 15 | 13 | 17 | 19 | 25 | 10 | 25% | 0 | 15 | 16 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 16 | 17 | 4 |
| 50% | 17 | 0 | 12 | 13 | 0 | 12 | 0 | 12 | 12 | 7 | 9 | 50% | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 100% | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 7 | 100% | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Tabela C3 – Teste Dunnet para o efeito crônico na reprodução de *Ceriodaphnia dubia* (comparação entre médias de neonatos por fêmea para os controles e as concentrações)

| Pontos de amostragem | Concentrações de exposição (%) | Valor de d' para o teste Dunnet | Contraste entre médias | Resultado estatístico |
|----------------------|--------------------------------|---------------------------------|------------------------|-----------------------|
| P1 | 6,25 | 4,42 | 5,5 | d.s |
| | 12,5 | | 6,7 | d.s |
| | 25 | | 3,6 | n.s |
| P2 | 6,25 | 6,39 | -0,3 | n.s |
| | 12,5 | | -7,7 | d.s |
| | 25 | | -10,5 | d.s |
| | 50 | | -3,0 | n.s |
| P3 | 6,25 | 6,45 | -6,9 | d.s |
| | 12,5 | | -7,1 | d.s |
| | 25 | | -9,1 | d.s |
| | 50 | | -1,3 | n.s |
| P4 | 6,25 | 6,31 | -4,4 | n.s |
| | 12,5 | | -1,9 | n.s |
| | 25 | | -2,5 | n.s |
| | 50 | | 2,2 | n.s |
| P5 | 6,25 | 6,41 | -2,8 | n.s |
| | 12,5 | | -9,4 | d.s |
| | 25 | | -10,3 | d.s |
| | 50 | | -3,2 | n.s |

n.s – não diferiu estatisticamente do controle d.s – diferiu estatisticamente do controle

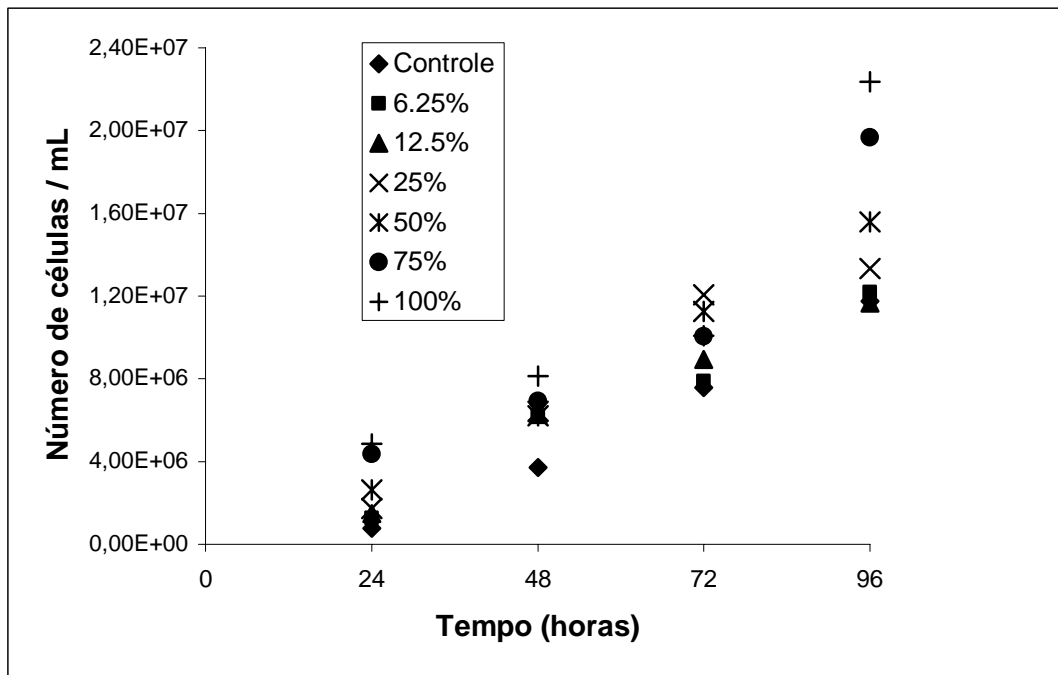


Figura C3 - Teste de toxicidade crônica com a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. Amostra avaliada: P1.

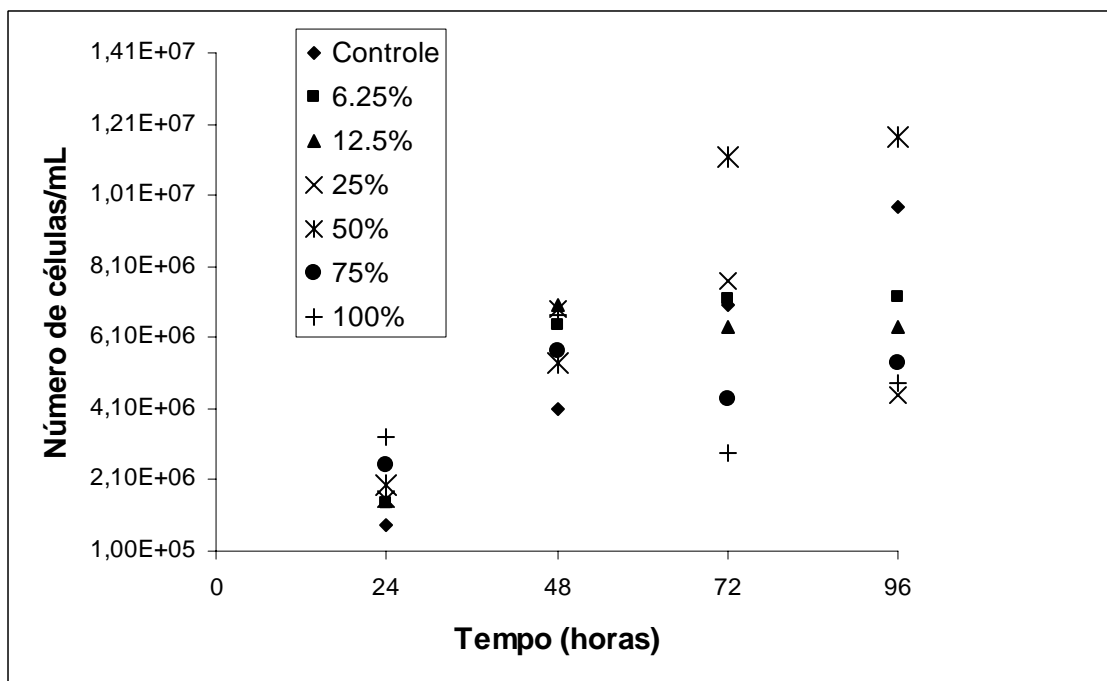


Figura C4 - Teste de toxicidade crônica com a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. Amostra avaliada: P1'.

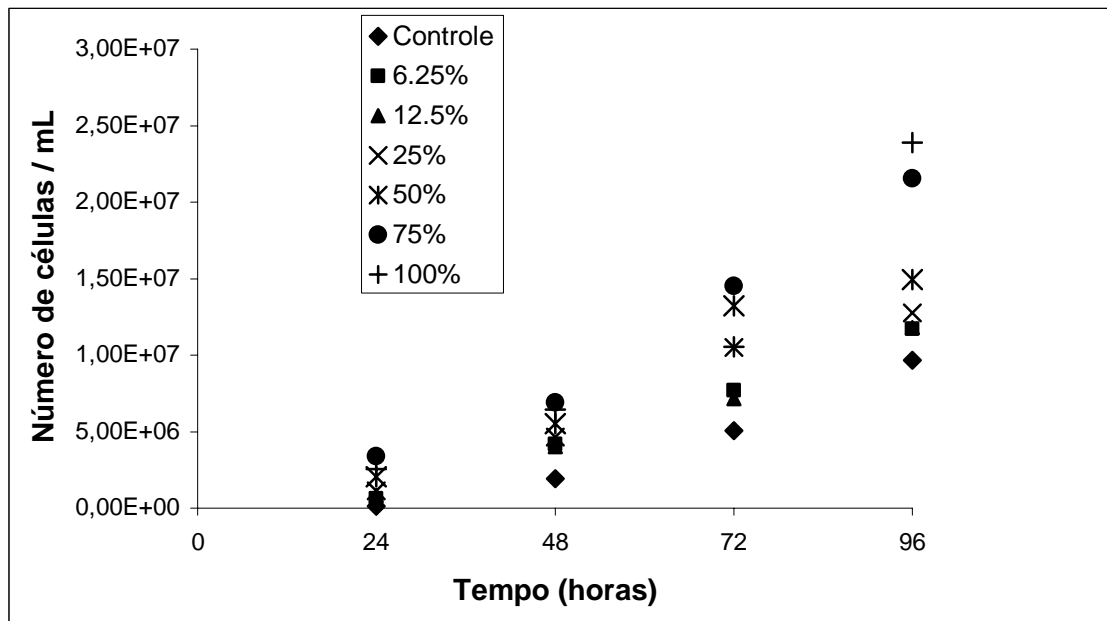


Figura C5 - Teste de toxicidade crônica com a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. Amostra avaliada: P1”.

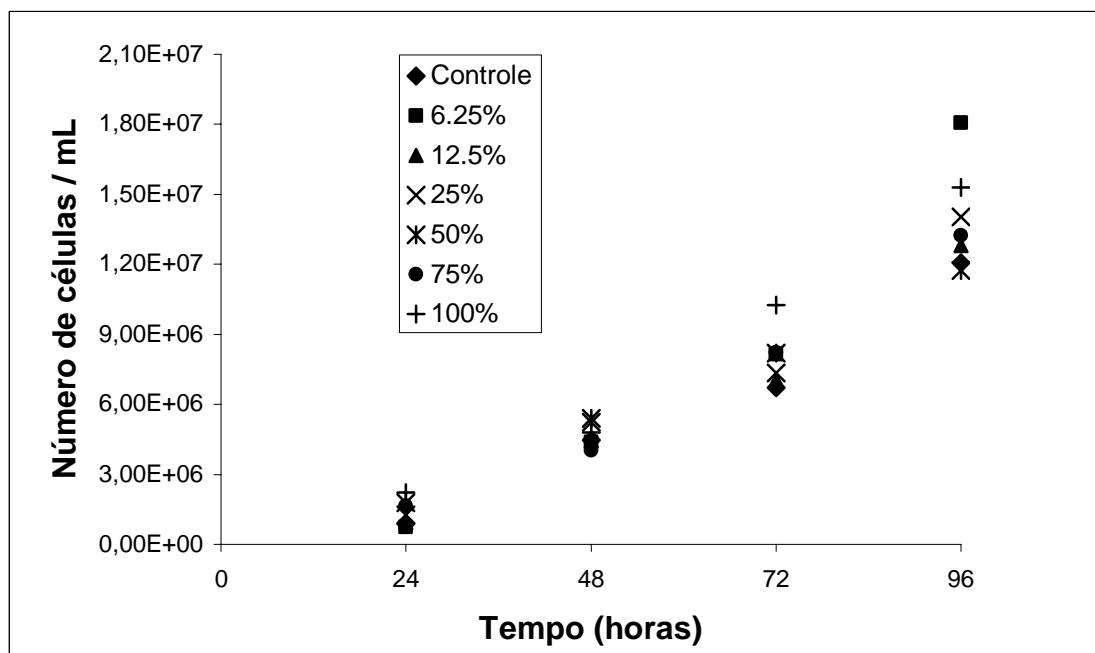


Figura C6 - Teste de toxicidade crônica com a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. Amostra avaliada: P5.

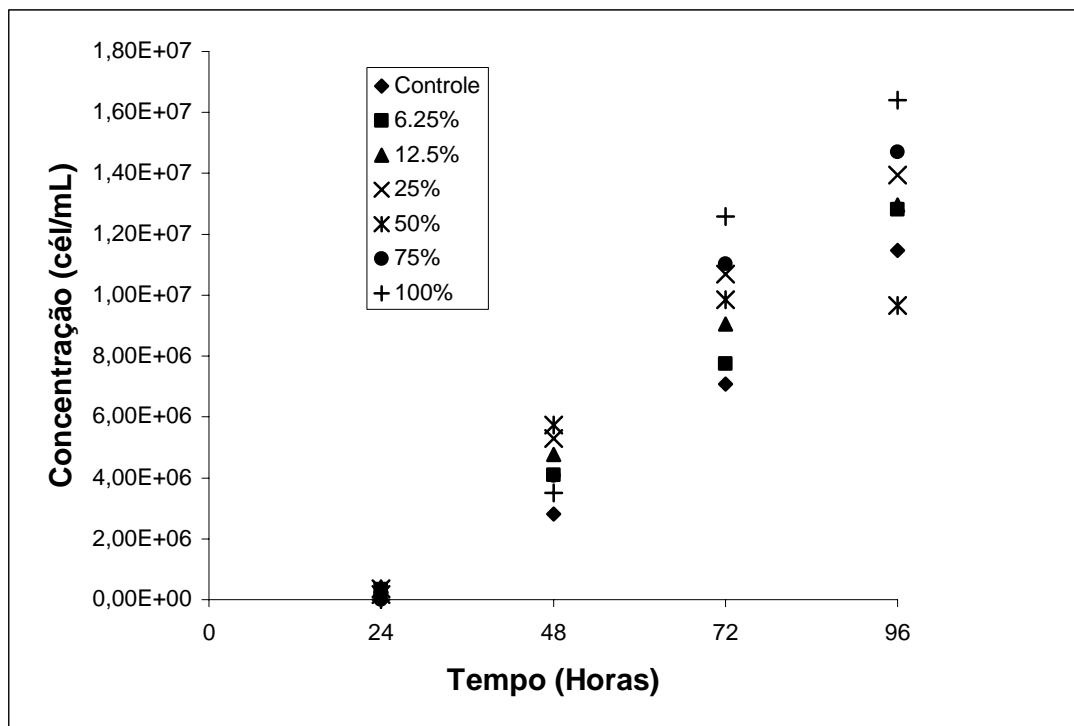


Figura C7 - Teste de toxicidade crônica com a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. Amostra avaliada: P5'.

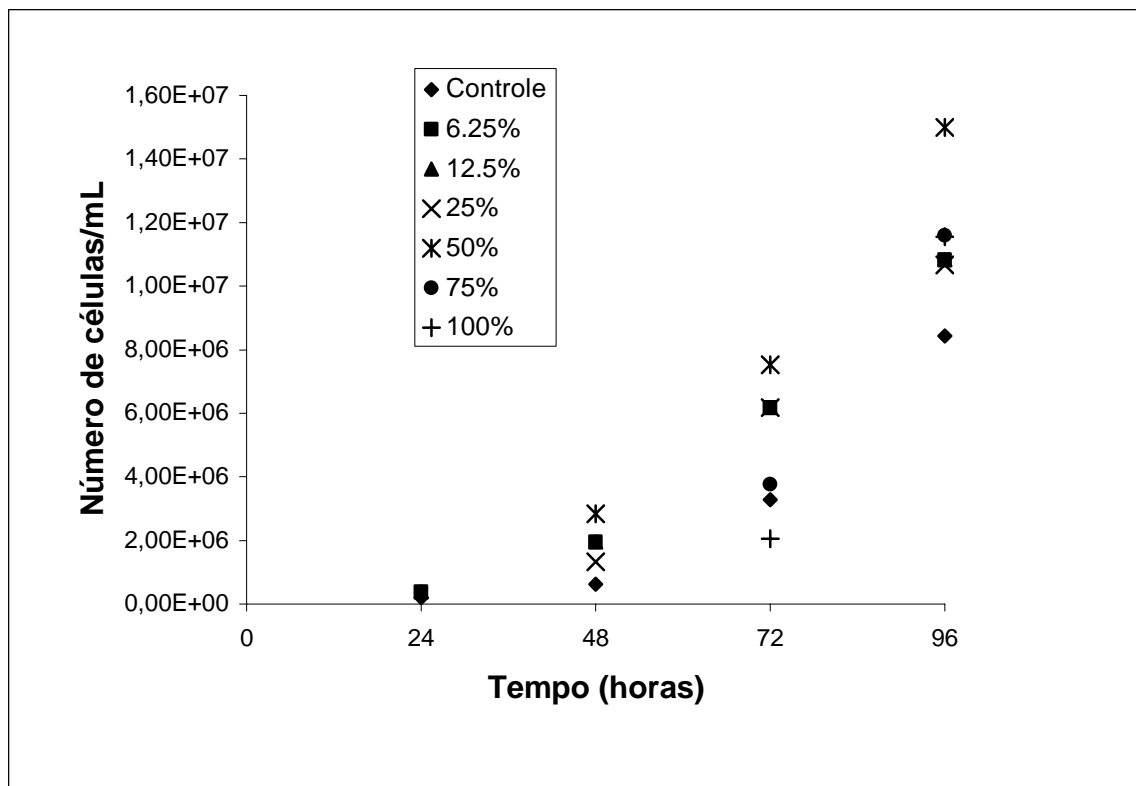


Figura C8 - Teste de toxicidade crônica com a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. Amostra avaliada: P5''.

Tabela C4 – Teste Dunnet para o efeito crônico no crescimento da alga *Pseudokirchneriella subcapitata* (contraste entre médias de células por mililitro de solução teste para os controles e as concentrações)

| Ponto de amostragem | Concentração de exposição, % | Valor de d' para o teste Dunnet | Contraste entre médias | Resultado estatístico |
|---------------------|------------------------------|---------------------------------|------------------------|-----------------------|
| P1 | 6,25 | 3783217 | -233333 | n.s |
| | 12,5 | | 266666,7 | n.s |
| | 25 | | -1133333 | n.s |
| | 50 | | -3100000 | n.s |
| | 75 | | -7066667 | d.s (1) |
| | 100 | | -9522222 | d.s (1) |
| P1' | 6,25 | 4545960 | 2555556 | n.s |
| | 12,5 | | 3388889 | n.s |
| | 25 | | 5300000 | d.s (2) |
| | 50 | | -1955556 | n.s |
| | 75 | | 4433333 | n.s |
| | 100 | | 4966667 | d.s (2) |
| P1'' | 6,25 | 13003640 | -2033333 | n.s |
| | 12,5 | | -2111111 | n.s |
| | 25 | | -3088889 | n.s |
| | 50 | | -5244444 | n.s |
| | 75 | | -4022222 | n.s |
| | 100 | | -1,4E+07 | d.s (1) |
| P5 | 6,25 | 5680028 | -5888889 | d.s (1) |
| | 12,5 | | -400000 | n.s |
| | 25 | | -1444444 | n.s |
| | 50 | | 1300000 | n.s |
| | 75 | | -55555,6 | n.s |
| | 100 | | -1766667 | n.s |
| P5' | 6,25 | 5425700 | -1333333 | n.s |
| | 12,5 | | -1477778 | n.s |
| | 25 | | -2477778 | n.s |
| | 50 | | 1811111 | n.s |
| | 75 | | -3222222 | n.s |
| | 100 | | -4922222 | n.s |
| P5'' | 6,25 | 2702715 | -1522222 | n.s |
| | 12,5 | | -2377778 | n.s |
| | 25 | | -2222222 | n.s |
| | 50 | | -1400000 | n.s |
| | 75 | | -3144444 | d.s (1) |
| | 100 | | -3100000 | d.s (1) |

n.s – não diferiu estatisticamente do controle d.s – diferiu estatisticamente do controle

1 – Estímulo ao crescimento das algas 2 – Toxicidade do efluente para as algas