

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA

TESE DE DOUTORADO

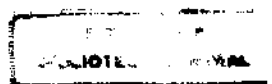
Valeria Reginatto

AVALIAÇÃO DO ENSAIO DE TOXICIDADE COM A ALGA
Scenedesmus subspicatus

PARA O ESTUDO DE EFLUENTES INDUSTRIAIS

Orientador: Prof. Dr. Nelson Eduardo Durán Caballero

Campinas
Agosto de 1998



**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA
UNICAMP**

Reginatto, Valeria

R263a Avaliação do ensaio de toxidade com a alga *Scenedesmus subspicatus* para o estudo de efluentes industriais / Valeria Reginatto. - - Campinas, [SP : s.n.], 1998.

Orientador: Nelson Eduardo Durán Caballero.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química.

I. Toxicidade. 2. Alga. 3. Efluente. I. Durán Caballero, Nelson Eduardo.
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

UNIDADE	IQ
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP
	72.263a
V.	Ex.
TOMBO BC	35784
PROC.	395/98
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	05/11/98
N.º CPDC	100/18234-7

Ao Jörn

“aus Liebe”

À vó Levina *in memorium*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Nelson Durán, pelas facilidades concedidas durante a realização do trabalho.

A Prof. Sabine Kunst pela possibilidade de realização dos trabalhos na Universidade de Hannover.

À Capes e ao CNPq pelas bolsas concedidas durante a realização dos trabalhos no Brasil e Alemanha respectivamente

Ao escritório internacional do GKSS, principalmente à pessoa do Dr. Bianchi pela concessão de bolsa na Alemanha.

Aos colegas do "Institut für Siedungswasserwirtschaft" pela acolhida e principalmente a Karin Gehardy e Corinna Lorey pelas análises de Pi-CG-EM.

À Aline Maia da EMBRAPA pelas análises estatísticas.

Aos colegas do laboratório de química biológica pelo carinho e atenção nas idas e vindas.

À amiga Cecília pelo forte apoio e mais pura prova de amizade em todos os momentos.

À Cleide pelo convívio prazeroso e pelas acolhidas sempre calorosas.

À Mirhianne pela amizade e preciosas horas dispensadas na revisão gramatical da tese.

À Roberta pelas discussões do trabalho em horas nem sempre apropriadas.

Ao Edgar, pelo apoio "informático".

Aos meus queridos pais Wilson e Dircema pela minha formação moral, indispensável em muitas situações vividas no decorrer do trabalho.

Aos meus irmãos Júnior e Daniel pela confiança e incentivo em todos os momentos.

Ao queridíssimo Jörn pela paciência e constante demonstração de amor.

ÍNDICE

ABREVIações

RESUMO / ABSTRACT

I - INTRODUÇÃO TEÓRICA	1
I.1- Ensaios de toxicidade	4
I.2- Ensaios de toxicidade com algas	10
I.3- Uso do ensaio de toxicidade com algas para a avaliação de “amostras coloridas”	18
OBJETIVOS GERAIS DO TRABALHO	22
II - MATERIAIS E MÉTODOS	23
II.1- Avaliação do ensaio de toxicidade com a alga <i>S. Subspicatus</i>	23
II.1.1 Ensaio com alga	23
a) Cultura da alga	23
b) Condições do ensaio	23
c) Resultado do ensaio	25
II.1.2 Métodos para medida da concentração da alga	26
a) Medida da absorvância	26
b) Determinação da fluorescência da clorofila <i>a in vivo</i>	26
c) Extração de clorofila	26
d) Determinação da massa seca das algas	27
e) Contagem do número de células	27
II.1.3 Estudo do inóculo no ensaio de toxicidade	28
II.1.4 Manutenção do pH no teste de toxicidade com alga	29

II.2- Estudo da toxicidade de efluentes de uma indústria produtora de pectina por métodos físico-químicos e ensaios de toxicidade	29
II.2.1 Descrição da amostragem	29
II.2.2 Caracterização físico-química dos efluentes	30
a) Demanda bioquímica de oxigênio - DBO ₅	31
b) Medida de carbono orgânico total e dissolvido - COT/COD	32
c) Demanda química de oxigênio - DQO	32
II.2.3 Caracterização ecotoxicológica dos efluentes	33
a) Ensaio respirométrico com lodo ativado	33
b) Ensaio com bactérias luminescentes	34
II.2.4 Distribuição da massa molecular dos efluentes	36
II.2.5 Caracterização dos efluentes por Pi-CG-EM	37
II.3- Uso do ensaio de toxicidade com alga para avaliação de efluentes e águas de ambientes naturais de coloração “escura”	37
II.3.1 Amostragem	37
II.3.2 Determinação de cor	38
II.3.3 Caracterização espectrofotométrica das amostras	39
II.3.4 Crescimento da alga sob diferentes distribuições espectrais de luz	39
II.3.5 Influência da cor das amostras na diminuição da oferta de luz para o crescimento da alga	39
III - RESULTADOS E DISCUSSÕES	40
III.1- Avaliação do ensaio de toxicidade com a alga <i>S. subspicatus</i>	40
III.1.1 Métodos para a determinação da concentração da alga	40
III.1.2 Estudo do inóculo da alga	46
III.1.3 Mudanças do pH no ensaio com algas	49
III.1.4 Conclusões parciais	58

III.2- Estudo da toxicidade de efluentes de uma indústria produtora de pectina por métodos físico-químicos e ensaios de toxicidade	59
III.2.1 Caracterização físico-química dos efluentes	59
III.2.2 Caracterização ecotoxicológica dos efluentes	61
a) método respirométrico com lodo	61
b) teste de toxicidade com bactéria luminescente	63
c) teste de toxicidade com alga	64
III.2.3 Distribuição da massa molecular dos efluentes	68
III.2.4 Caracterização dos efluentes por Pi-CG-EM	70
III.2.5 Conclusões parciais	80
III.3- Uso do ensaio de toxicidade com alga para avaliação de efluentes e águas de ambientes naturais de coloração “escura”	81
III.3.1 Caracterização espectrofotométrica das amostras	82
III.3.2 Interferência(s) no crescimento da alga em função da absorção de luz pelas amostras “escuras”	83
a) influência da distribuição espectral da luz	85
b) influência da iluminação	87
III.3.3 Interferência da coloração da amostra na determinação da concentração da alga	90
III.3.4 Conclusões parciais	93
IV - CONCLUSÕES GERAIS	94
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95
ANEXOS	

ABREVIATÖES

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
CE20	concentração que inibe em 20% o parâmetro subletal observado
CE50	concentração que inibe em 50% o parâmetro subletal observado
CG-EM	cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa
COD	carbono orgânico dissolvido
COT	carbono orgânico total
DBO	demanda bioquímica de oxigênio
DIN	Deutsches Institut für Normung
DQO	demanda química de oxigênio
EN	European Economic Community
ETAD	Ecological and Toxicological Association of Dyes and Organic Pigments Manufacturers
IFA	irradiação fotossinteticamente ativa
ISO	International Standard Organization
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development
PI-CG-EM	pirólise-cromatografia gasosa-espectrometria de massa
SH	substâncias húmicas
SNIST	Standard National Institut for Science and Technology"
STE	sistema de tratamento de efluentes
U.S.EPA	United Stated Environmental Protection Agency
UV-Vis	luz ultravioleta - visível

RESUMO

AVALIAÇÃO DO ENSAIO DE TOXICIDADE COM A ALGA *SCENEDESMUS subspicatus* PARA O ESTUDO DE EFLUENTES INDUSTRIAIS

Valeria Reginatto

orientador: Prof. Dr. Nelson Eduardo Durán Caballero

Laboratório de Química Biológica, Instituto de Química

Universidade Estadual de Campinas

Palavras-chaves: efluentes, ensaios de toxicidade; algas

Os estudos preliminares com a alga *Scenedesmus subspicatus* visaram avaliar os diferentes métodos padronizados do ensaio de toxicidade recomendados por órgãos internacionais, como a Internacional Standard Organization (ISO 8692). Nesse sentido foram comparados distintos métodos para a determinação da concentração da alga, as melhores condições de inóculo para o ensaio e as alterações do pH durante a realização do mesmo.

Tendo em vista os resultados obtidos por esses estudos, foi feita uma avaliação ecotoxicológica de efluentes coletados em diferentes etapas do sistema de tratamento de efluentes de uma indústria produtora de pectina, usando métodos físico-químicos e três ensaios de toxicidade com organismos distintos: a alga *S. subspicatus*, a bactéria luminescente *V. fischeri* e uma população mista de microorganismos (lodo ativado).

Os resultados desse estudo demonstraram que as análises físico-químicas convencionais não forneceram informações suficientes para caracterizar a toxicidade apresentada pelos efluentes frente a alga e a bactéria luminescente. A filtração em gel em Sephadex G-50 dos referidos efluentes revelou uma elevada distribuição da massa molecular (em torno de 20 kD) dos mesmos. Pirólise seguida de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (Pi-CG-EM) também foi utilizada para investigar a composição dos efluentes, indicando a natureza poliaromática das amostras estudadas.

Como, além da toxicidade, os efluentes apresentavam uma coloração marrom escura, suspeitou-se que a toxicidade pudesse estar relacionada com a cor das amostras.

Em vista disso foram avaliados efluentes industriais, águas de ambientes naturais de coloração "escura" (pantanosas) e soluções de substâncias húmicas (SH) comerciais pelo ensaio de toxicidade com alga. O crescimento da alga nas amostras "escuras" foi verificado, aumentando-se a intensidade luminosa a fim de ser atinjida a faixa de saturação de luz, ou seja, a faixa de luz na qual ocorria o crescimento máximo da alga.

Para as amostras mais escuras ($Abs_{436nm} > 0,8$), o efluente de pectina e a solução de SH ($0,2 \text{ g.L}^{-1}$), a saturação de luz foi encontrada entre 8000-10000 Lux, diferente da faixa de luz sugerida pela norma ISO 8692 para a realização do ensaio (entre 6000 e 10000 Lux).

A comparação dos resultados de toxicidade das amostras "escuras" obtidos por fluorescência da clorofila *a* e pela extração da clorofila *a* para a determinação da concentração de alga, demonstrou que os resultados de toxicidade poderiam estar sendo influenciados pela coloração das amostras.

Os resultados desse trabalho demonstraram que apesar da reconhecida importância do ensaio de toxicidade com alga, este apresenta limitações quando se deseja avaliar amostras "escuras" e, em função disso, os protocolos oficiais necessitam ser revistos.

ABSTRACT

EVALUATION OF THE ALGAE GROWTH INHIBITION TEST WITH *SCENEDESMUS subspicatus* TO ASSAY INDUSTRIAL EFFLUENTS

Valeria Reginatto

supervisor: Prof. Dr. Nelson Eduardo Durán Caballero

Laboratório de Química Biológica, Instituto de Química

Universidade Estadual de Campinas

key-words: effluents, toxicity assay; algae

The preliminary studies with the algae *Scenedesmus subspicatus* were conducted in order to evaluate different official protocols for bioassays recommended by international organizations, as the International Standard Organization (ISO 8692). Distinct methods to determine algae concentration, optimal inoculum conditions and pH alterations during the assay were compared.

According to these results, effluents toxicity from a pectin industry effluent treatment system were assayed, using physical-chemical methods and three different toxicity bioassays: algae *Scenedesmus subspicatus*, luminescent bacteria *Vibrio fischeri* and activated sludge as bioindicator.

The results showed that the conventional physical-chemical analyses were not sufficient to characterize effluents toxicity to algae and luminescent bacteria. Gel filtration on Sephadex G-50 showed a high molecular weight distribution (about 20 kD) of the effluents. Pyrolyse-gas-chromathography-mass spectroscopy (Py-GC-EM) was used to investigate the effluent composition. The identification of the obtained pyrolysis fragments indicated effluents of polyaromatic nature.

Moreover, the analysed effluents were dark brown coloured, therefore it was suspected that the toxicity could be correlated with the sample colour. Then several dark brown coloured waters from marsh, industrial wastewaters and comercial humic substances (HS) solutions were investigated by the algae bioassay. The algae growth in dark coloured waters were verified by increasing the light intensity in order

to reach light saturation, where the maximum of algae growth were observed. Darker samples ($Abs_{438nm} > 0,8$), final pectin effluent and HS solution ($0,2 \text{ g.L}^{-1}$) showed a light saturation between 8000-10000 Lux, different of the light intensity suggested by the ISO Norm 8692 (between 6000-10000 Lux).

A comparison between toxicity results of dark coloured waters, obtained with different methods to measure algae concentration, like chlorophyll a fluorescence, chlorophyll a extration showed that the toxicity results could have been influenced by the colour of the samples.

The results of this work demonstrate that beyond the recognized importance of algae growth inhibition test, this showed limitations in the evaluation of dark samples, therefore the official protocols should be reviewed.

I- INTRODUÇÃO TEÓRICA

Com o crescimento da industrialização ocorrida nos últimos 30 anos e o concomitante aumento da demanda de produtos químicos, intensificaram-se os problemas relacionados com a liberação desses compostos no meio ambiente. Cerca de 70.000 compostos químicos estão disponíveis no mercado e mais 500 a 1.000 novos compostos são produzidos anualmente, os quais, de alguma forma, serão descartados ou em efluentes domésticos ou industriais (Blum e Speece, 1991). Recrudescendo o estresse ambiental em decorrência da industrialização, exigiu-se o desenvolvimento de métodos mais eficazes para a caracterização desses produtos, principalmente, quanto à avaliação do potencial tóxico dos mesmos ao ecossistema.

O controle da carga poluidora ou tóxica de efluentes é realizado, tradicionalmente, pela determinação de variáveis como a Demanda Bioquímica de Oxigênio-DBO, Demanda Química de Oxigênio-DQO, sólidos em suspensão, metais e outros agentes tóxicos, cujos limites estão bem estabelecidos nas legislações ambientais. No entanto, a grande variedade de substâncias químicas existentes e a composição indefinida encontrada nos efluentes dificultam a avaliação dos seus possíveis efeitos tóxicos apenas pela utilização de métodos físico-químicos (CETESB, 1994).

Para suprir as limitações e complementar as informações obtidas pelas análises físico-químicas foram desenvolvidos os ensaios de toxicidade, os quais utilizam organismos vivos como indicadores de efeitos tóxicos (Peter e col., 1995; Sáenz e col., 1997). O uso de tais ensaios em estudos de toxicidade permite a obtenção de importantes informações, como por exemplo:

- a) sobre a toxicidade de novos compostos químicos que pretendem ser lançados no mercado (informações necessárias para o registro comercial dos mesmos);
- b) a respeito do potencial tóxico de efluentes, isto é, o provável efeito que os efluentes vão causar sobre as espécies vivas quando eles forem lançados no meio ambiente;

c) na avaliação da qualidade de águas superficiais;

d) permite esclarecer também se a adição de algum novo produto em processos industriais irá alterar de alguma forma a eficiência do sistema de tratamento de efluentes (Bitton e Dutka, 1986; Lewis, 1995; Jung e Bitton, 1997).

Uma das principais vantagens da utilização dos ensaios de toxicidade sobre as análises químicas, é que aqueles levam em consideração as interações dos compostos analisados entre si e com o meio ambiente.

No tocante ao estudo de efluentes, normalmente compostos por uma mistura de substâncias, os teste de toxicidade permitem observar o efeito tóxico total do efluente, detectando as possíveis interações entre os seus componentes. Estas interações manifestam-se aumentando a toxicidade de substâncias isoladas (efeito sinérgico), diminuindo-a (efeito antagónico) ou somando-a (efeito aditivo).

Um exemplo de sinérgismo entre compostos foi observado por Vanegas e col. (1997), ao relatarem o aumento da toxicidade dos metais cádmio e zinco quando estes apresentaram-se numa mistura, comparando com as suas toxicidades individuais sobre o crustáceo *Penaeus setiferus*. Efeito similar foi encontrado por Bervoets e col. (1996), os quais inferiram uma toxicidade inferior a um efluente industrial baseando-se na soma das toxicidades individuais dos compostos químicos encontrados num efluente industrial.

Cheng-Fang e col. (1994) observaram um efeito antagónico significativo quando compararam a toxicidade de uma mistura de efluentes industriais com as toxicidades individuais dos efluentes. Os autores atribuíram esse efeito ao íon carbonato, presente em alta concentração num dos efluentes, o qual possui a capacidade de combinar-se a metais reduzindo a toxicidade de outros efluentes com altas concentrações de metais pesados.

As interações entre os componentes de efluentes também são observadas para misturas de poluentes orgânicos. Nesse sentido, Pedersen e Petersen (1996), realizaram um estudo da toxicidade de misturas de compostos orgânicos, escolhendo 4 classes de compostos com diferentes mecanismos toxicológicos. Os pesquisadores testaram as suas toxicidades tanto individuais quanto em mistura (de 5, 10 e 15 componentes) frente a 5 espécies de organismos diferentes. O estudo relacionou a lipofilicidade ($\log k$) das misturas (estudo relação estrutura - atividade)

com as suas toxicidades sobre os organismos. Na maior parte das misturas estudadas foi encontrado um efeito aditivo, isto é, a toxicidade total da mistura correspondeu à soma das toxicidades individuais dos seus componentes.

Além da possibilidade de interações entre os constituintes dos efluentes, a toxicidade é influenciada pelas características físico-químicas do meio no qual estes efluentes serão descartados. As características físico-químicas do meio vão influenciar, principalmente, a biodisponibilidade dos compostos tóxicos, isto é, a capacidade desses compostos serem assimilados pelos organismos vivos.

A toxicidade dos metais, por exemplo, está relacionada com as condições às quais o metal está exposto, tais como pH, salinidade, dureza, matéria orgânica, temperatura, etc. O efeito do pH sobre a toxicidade será discutido com mais detalhes no item 1.2.

A importância da concentração salina do meio relaciona-se, principalmente, ao fato de a concentração iônica poder alterar o potencial tóxico de metais. Supõe-se que esse efeito ocorra devido a uma competição entre os íons tóxicos com íons cloreto da amostra nas membranas da célula (Gunkel, 1994). Ferguson e Hogstrand (1998) observaram a diminuição da toxicidade da prata com o aumento da salinidade até 25 ‰. O aumento da concentração do íon cloreto alterou a especiação do metal, o qual, na forma AgCl_n , apresentou toxicidade bem mais baixa que o metal na forma Ag^+ . Porém, em salinidades acima de 25 ‰ foi observado um aumento da toxicidade do metal, a qual foi atribuída ao desequilíbrio osmótico causado pelos íons cloreto.

No que concerne ao efeito da dureza sobre a toxicidade de metais, sabe-se que a presença de carbonato de cálcio ou magnésio em águas pode ocasionar a complexação de metais, tornando-os insolúveis e por isso não disponíveis para penetrar nas membranas dos organismos vivos. Nesse sentido, Stubblefield e col. (1997) verificaram que a presença de carbonatos na água alterou significativamente a toxicidade crônica do manganês sobre a espécie aquática *Salmo trutta*. Os autores observaram a diminuição da toxicidade do manganês com o aumento da concentração de CaCO_3 . O efeito da diminuição da toxicidade com o aumento da dureza das águas também foi observado, pelos mesmos autores, para outros metais como o cobre, zinco e cádmio.

A concentração de matéria orgânica encontrada no ambiente aquático também influencia na toxicidade de xenobióticos, sejam eles metais ou compostos orgânicos (Kopinke e col., 1995). As interações da matéria orgânica com agentes tóxicos são muito estudadas e são regidas por fatores físico-químicos tais como pH (Pawlik-Skowronska e col., 1997), irradiação de luz visível (Kamiya e Kameyama, 1998) e potencial redox (Tingzong e col., 1997).

A propriedade da matéria orgânica de se ligar aos poluentes faz com que a toxicidade dos mesmos diminua, pelo comprometimento da biodisponibilidade em virtude do tamanho da molécula ao qual estão ligados (Lawler e col., 1995).

Em resumo: enquanto as análises químicas podem determinar a concentração de compostos tóxicos, elas não fornecem, necessariamente, informações a respeito do seu potencial tóxico ou a respeito da sua biodisponibilidade sobre os organismos vivos. Por outro lado, os ensaios de toxicidade são extremamente úteis na avaliação de potenciais tóxicos, mas não são capazes de identificar nem quantificar os compostos responsáveis pela toxicidade (Guzzella e Mingazzini, 1994). Por esse motivo, a maior parte dos estudos atuais em ecotoxicologia são realizados utilizando-se uma combinação de análises químicas e ensaios de toxicidade.

I.1- ENSAIOS DE TOXICIDADE

A idéia de que organismos vivos podem indicar a qualidade do meio ambiente é amplamente difundida. Pode-se detectar a poluição de corpos d'água tanto pela observação da mortalidade dos organismos-indicadores, quanto pelo estresse fisiológico causado por poluentes. O estresse fisiológico pode ser revelado pela diminuição da taxa de crescimento, perda da capacidade reprodutiva ou mudança de comportamento dos organismos (CETESB, 1994).

Nos E.U.A e Europa empregam-se os ensaios de toxicidade para a avaliação da qualidade de águas e de efluentes desde o início da década de 70, tendo sido regulamentados a partir dos anos 80 (Hellawell, 1986; Assami e col., 1996). Os primeiros ensaios de toxicidade usavam algas e bactérias como indicadores

biológicos e limitavam-se a observar a mortalidade das espécies estudadas. Muitos desses testes são utilizados até hoje e uma diversidade de novos ensaios têm sido desenvolvidos (Isomaa e Lilius, 1995).

No Brasil, mais especificamente no Estado de São Paulo, o Decreto 8468 de 1976, o qual estabelece os limites para a emissão de efluentes, sofreu uma revisão que deverá ser regulamentada até o final de 1998, quando os testes de toxicidade com organismos aquáticos são previstos para a avaliação do impacto causado por efluentes tóxicos em corpos d'água (CETESB, 1997). Porém, mesmo não sendo exigidos por lei, os ensaios de toxicidade vêm sendo utilizados aqui há alguns anos para a monitoração de efluentes de indústrias consideradas poluentes, como é o caso da indústria papeleira (Bertoletti e col., 1988; Araújo e col., 1991), petrolífera (Araújo, 1990), entre outras (Bertoletti, 1990) e, principalmente, como parâmetro para a avaliação de qualidade de águas superficiais (Zagatto e col., 1987; Tundisi e Matsumura-Tundisi, 1992; CETESB, 1996).

A escolha do ensaio de toxicidade mais adequado depende do propósito do estudo a ser realizado e deve considerar os seguintes fatores: sensibilidade, distribuição geográfica, abundância, importância ecológica e relevância do organismo indicador para os propósitos do estudo a ser realizado (APHA, 1992).

Uma das limitações encontradas para o emprego de organismos vivos como indicadores de toxicidade é a diferença de sensibilidade apresentada pelos organismos frente aos compostos químicos ou efluentes. Alguns esforços têm sido feitos com o objetivo de encontrar uma espécie de organismo que seja sensível a todos ou a maior parte dos compostos químicos (Blum e Speece, 1991; Pedersen e Petersen, 1996). Porém, tais trabalhos têm relatado a diferença entre as respostas de toxicidade obtidas para um mesmo composto sobre organismos de espécies diferentes.

Com base nesses estudos, pode-se afirmar que o efeito tóxico de um efluente sobre um organismo de determinada espécie não pode ser simplesmente extrapolado para outras espécies. Sendo assim, a avaliação da toxicidade de efluentes não deve ser realizada apenas por um único ensaio de espécie única (que utiliza apenas um organismo representante de um único nível trófico). Para uma avaliação mais adequada recomenda-se o uso de uma bateria de ensaios, isto é,

uma série de testes que utilizem organismos representantes de diferentes níveis da cadeia alimentar (Basso e col., 1990; Isomaa e Lilius, 1995).

Na Europa, desde 1993, uma bateria de testes com espécies únicas (teste de toxicidade aguda para peixes e crustáceo (daphnia), teste de inibição do crescimento de algas e bactérias), é obrigatória para a identificação do potencial tóxico de substâncias (Furlong, 1995). Na Dinamarca, são exigidos 5 ensaios com espécies de organismos diferentes para a permissão da descarga de efluentes: o ensaio com a alga verde (*Rhaphidocellis subcapitata*), daphnia (*Daphnia magna*), peixe (*Brachydanio rerio*), macrófito (*Lemna minor*) e com a bactéria luminescente (*Vibrio fischeri*) (Pedersen e Petersen, 1996).

Os principais representantes dos produtores primários, tanto em ambientes aquáticos marinhos como em águas doces, são as algas (Sáenz e col., 1997). A importância do uso de algas como indicadores biológicos deve-se, principalmente, à posição ocupada na cadeia alimentar do ecossistema. Como produtores primários, elas situam-se na base da cadeia alimentar e as alterações ocorridas na dinâmica da comunidade poderão afetar os níveis superiores do ecossistema (Lewis, 1995). Outras vantagens da utilização destes organismos em ensaios de toxicidade são a sua grande sensibilidade às alterações ocorridas no meio ambiente e ao fato de possuírem um ciclo de vida relativamente curto, possibilitando a observação dos prováveis efeitos tóxicos em várias gerações (Lewis, 1995; Wundram e col., 1996). A escolha de uma espécie-teste de alga depende da sua disponibilidade, exigências nutricionais e facilidade de uso. Baseado nesses critérios, algumas espécies de microalgas têm sido utilizadas como indicadores de toxicidade, tais como: *Selenastrum capricornutum*, atualmente denominada como *R. subcapitata* (Arensberg e col., 1996; Pedersen e Petersen, 1996; Bailey e Young, 1997; Sáenz e col., 1997), *Scenedesmus subspicatus* (Peter e col., 1995; Sáenz e col., 1997), *Microcystis aeruginosa* (Lewis, 1995), *Chlorella vulgaris* (Araújo e col., 1991; Sáenz e col., 1997), *Dunaliella tertiolecta* (Abalde e col. 1995; Peterson e Stauber, 1996), e, *Chlamydomonas* (Wundram e col. 1996).

Além das algas, algumas espécies de plantas, também representantes dos produtores primários são, freqüentemente, usadas como organismos-indicadores de toxicidade. A planta vascular da espécie *Lemna spp* é muito utilizada e os gêneros

Lemna minor, *L. gibba* e *L. perpusilla* são as espécies-teste mais encontradas na literatura (APHA, 1992; Duxbury e col., 1997; Huang e col., 1997).

Entretanto, uma das desvantagens da utilização das plantas vasculares em ensaios de toxicidade é que algumas delas possuem a capacidade de acumular substâncias tóxicas. Esta característica confere às plantas vasculares uma menor sensibilidade aos efeitos tóxicos do que as algas (Wundram e col., 1996; Duxbury e col., 1997). Pedersen e Petersen (1996) verificaram a variação de sensibilidade de organismos aquáticos frente a diferentes agentes tóxicos. Nesse estudo a alga *R. subcapitata* apresentou sensibilidade 8 vezes maior ante a dietanolamina do que o macrófito *L. minor*.

Os ensaios de toxicidade que usam algas ou plantas como indicadores consistem, basicamente, no crescimento destas em diferentes diluições do efluente ou substância a ser avaliada, na qual é adicionada uma solução de nutrientes de composição definida. A duração do ensaio varia conforme a espécie-indicadora e pode ser de algumas horas até 7 dias, período no qual são comparados parâmetros como biomassa, concentração de clorofila, atividade fotossintética e/ou crescimento em relação a um controle (Lewis, 1995).

Bactérias, fungos e leveduras são utilizados como indicadores em função da sua simplicidade, rapidez e baixo custo, não só na monitoração de efluentes, mas também na avaliação do potencial tóxico e biodegradabilidade de novos compostos. Entre os testes mais utilizados está o teste Microtox® (Beckman Instruments Inc) ou Lumistox® (Dr. Lange GmbH) que utiliza a bactéria luminescente *Photobacterium phosphoreum*, atualmente denominada de *Vibrio fischeri* (Assami e col, 1996; Jung e Bitton, 1997). Esse ensaio mede a redução da luminescência emitida naturalmente pela bactéria quando em contato com um agente tóxico, pela inibição da enzima luciferase. Essa enzima está envolvida no metabolismo aeróbico da bactéria, conforme representado na figura 1.

As vantagens do ensaio com a bactéria luminescente são a sua simplicidade e a alta reprodutibilidade dos resultados entre diferentes laboratórios, porém, o sistema Microtox® é criticado por empregar uma bactéria marinha de pouco significado ecológico (Garic e col., 1993). Por este motivo, normalmente, o sistema Microtox® é utilizado para medir toxicidade aguda de efluentes como parte de uma

bateria de ensaios de toxicidade usando diferentes organismos indicadores. Oanh e Bengtsson (1995) empregaram diferentes ensaios sendo o teste Microtox®, a alga *S. capricornutum* e a planta aquática *Lemna aequinoctialis* utilizados para avaliar a toxicidade de efluente de indústria papeleira. A alga *S. capricornutum* foi o organismo mais sensível ao efluente, seguido da bactéria *V. fischeri*, enquanto *L. aequinoctialis* não apresentou sensibilidade alguma.

Outro tipo de ensaio muito utilizado são os testes respirométricos. Estes medem o consumo de oxigênio ou a produção de CO_2 dos bioindicadores. Os organismos utilizados possuem, normalmente, uma taxa de reprodução alta permitindo a obtenção de resultados rápidos, como por exemplo a *Escherichia coli* (Jardim e col., 1993).

Fargasová e Drtil (1996) desenvolveram um ensaio respirométrico no qual a alga *Scenedesmus quadriculata* foi utilizada como indicador. O teste fundamentou-se no aumento da respiração da alga e conseqüente diminuição da taxa de fotossíntese quando em contato com o agente tóxico.

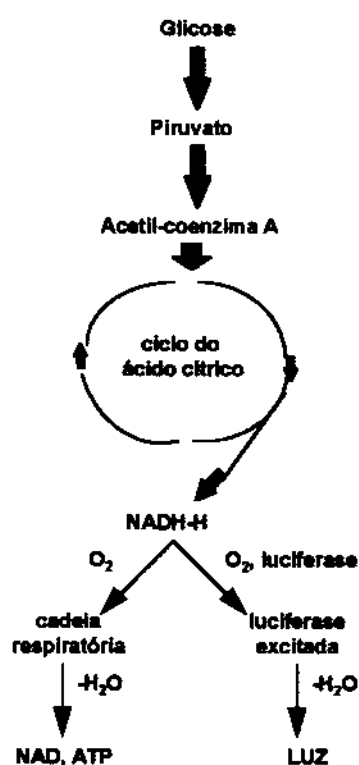


Figura 1: esquema do metabolismo da bactéria luminescente *V. fischeri*. (Gunkel, 1994).

O período de exposição dos indicadores biológicos aos efluentes ou compostos estudados pode variar de minutos (5, 15 ou 30 minutos para o teste Microtox®) até dias (96 horas no teste de toxicidade crônica com *C. dubia* e 7 dias para o ensaio com *L. minor*) para os diferentes testes. Existe um interesse mundial para padronizar os resultados, a fim de se facilitar sua comparação. Na tabela 1, estão apresentadas as formas mais usuais de descrição dos resultados dos ensaios de toxicidade usadas internacionalmente.

Tabela 1: medidas-padrão de toxicidade de efluentes e substâncias tóxicas

Medida	Símbolo	Definição
Concentração letal 50	CL50	concentração que causa a mortalidade de 50% da população de organismos
Concentração efetiva 50	CE50	Concentração que causa 50% de perda do parâmetro subletal observado
Concentração efetiva não observável	CENO	concentração na qual a toxicidade não é mais estatisticamente significativa
Concentração efetiva mínima	CEM	menor concentração onde um efeito tóxico estatisticamente significativo é encontrado

Os ensaios de toxicidade mais comuns, anteriormente descritos, usam espécies únicas, ou seja, apenas um organismo-indicador, representante de um único nível trófico para avaliar toxicidade. Apesar de esses testes serem amplamente difundidos pela sua facilidade de realização e baixos custos envolvidos, a sua utilização tem sido criticada. Aponta-se como desvantagem o fato de os testes com espécies-únicas ignorarem totalmente a interação entre os indivíduos de outras espécies que formam o ecossistema (Isomaa e Lilius, 1995).

Para solucionar esses problemas, alguns pesquisadores desenvolveram testes de toxicidade, nos quais mais de uma espécie de organismo-indicador é utilizada. Esses testes são denominados ensaios multi-espécies ou microcosmos e permitem a observação das interações entre as espécies estudadas (Giddings e col. 1996; Sugiura, 1996).

Os métodos de ensaios de toxicidade do tipo-microcosmos mais simples são os que utilizam o lodo ativado (consórcio de microorganismos formado por bactérias, fungos, leveduras, protozoários e metazoários) como indicador biológico. Nessa linha, os mais empregados são os ensaios da DBO e o teste respirométrico com lodo ativado. Ambos os métodos utilizam a respirometria como princípio e, apesar de o ensaio de DBO não ser considerado um teste de toxicidade, fornece informações a respeito da biodegradabilidade de compostos e/ou efluentes.

O método com lodo ativado tem como princípio a observação da mudança da respiração dos microorganismos componentes do lodo, quando diferentes concentrações de efluentes são adicionadas ao meio. A respiração do lodo é determinada pela concentração de oxigênio dissolvido medida com auxílio de um eletrodo específico de O_2 . O esquema para a realização deste ensaio está representado na figura 2.

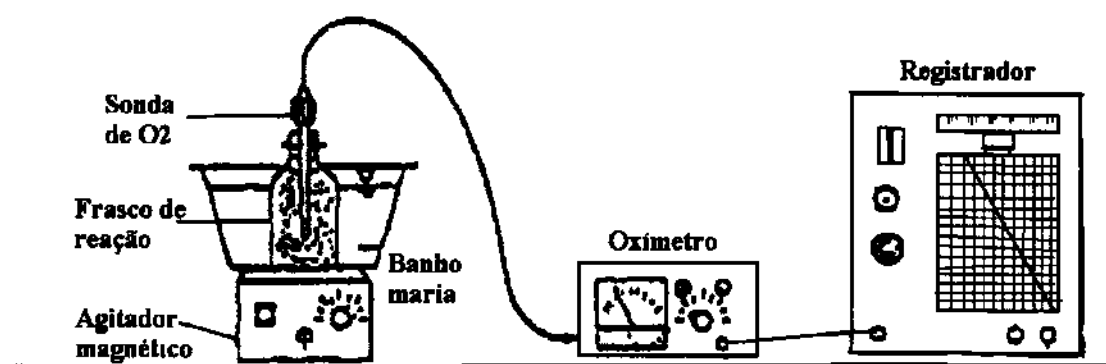


Figura 2: representação esquemática do ensaio respirométrico utilizando lodo ativado

1.2- ENSAIOS DE TOXICIDADE COM ALGA

A escolha de um ensaio de toxicidade que utiliza alga como organismo-indicador deve-se não apenas ao pioneirismo das algas como indicadores de toxicidade e a sua reconhecida importância ecológica, mas também ao grande

número de questões levantadas na literatura envolvendo a otimização desse ensaio (Comber e col., 1995; Arensberg e col., 1996; Chen e Lin., 1997; Clarkson e col., 1998).

Os primeiros estudos usando algas como organismo-teste foram realizados na década de 50. Eles eram relacionados com a avaliação da qualidade de águas superficiais em relação à eutrofização (Beyruth e col., 1992). Já em 1956, Bringmann e Kühn utilizaram algas como indicadores de eutrofização de águas superficiais e, alguns anos mais tarde, os mesmos pesquisadores usaram um conjunto de algas, bactérias e microcrustáceos para detectar a presença de substâncias tóxicas em efluentes (Bringmann e Kühn, 1959). Os primeiros experimentos eram feitos de forma primitiva, nos quais não era utilizado um meio de cultura sintético, mas efluente esterilizado suplementado com alguns nutrientes. Apenas na década de 60 é que um meio de cultura sintético começou a ser utilizado (Bringmann e Kühn, 1965).

Nos Estados Unidos, em 1969, os primeiros trabalhos de padronização do ensaio com algas tiveram início pela divulgação do "Provisional Algal Assay Procedure" (PAAP), um método provisório do ensaio com algas. Dois anos mais tarde, foi publicado o primeiro método padronizado de ensaio com algas denominado "Algal Assay Procedure: Bottle Test" (AAP) (Maloney e Miller, 1975).

Em 1972, laboratórios do norte europeu reuniram-se para comparar os métodos utilizados no estudo da eutrofização de águas superficiais. Os resultados obtidos pela realização desse trabalho serviram, posteriormente, para a padronização do método do teste de toxicidade com algas (Claesson, 1975).

A partir da década de 80, vários métodos, ainda utilizados atualmente, foram padronizados. Dentre os métodos existentes, os mais difundidos são os sugeridos pela "Organization for Economic Cooperation and Development" (OECD, 1984), "European Economic Community" (EN, 1993), e pela "International Standard Organization" (ISO, 1989), sendo os dois últimos iguais. Ainda com a padronização dos métodos por órgãos internacionais, alguns países desenvolveram sua própria metodologia, apresentando algumas variações entre si, como por exemplo nos Estados Unidos, onde o método utilizado é sugerido pela "United States

Environmental Protection Agency - U.S.EPA" (APHA, 1992) e na Alemanha pelo "Deutsches Institut für Normung" (DIN 38412 Teil 9, 1989; DIN 38412 Teil 33, 1991).

O Brasil possui uma norma técnica da Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT (NBR 12648) para o teste com alga desde 1992, o qual utiliza *C. vulgaris* ou *S. capricornutum* (ABNT, 1992).

Todos os métodos padronizados possuem o mesmo princípio: o crescimento das algas em diferentes concentrações da água residual ou agente químico a ser avaliado, ao qual é adicionado um porcentual de solução nutriente. Após um determinado período de tempo, o crescimento da alga é comparado com um controle e poderá ser inibido ou não, dependendo da concentração e da ação tóxica do agente analisado (Bitton e Dutka, 1986). As diferenças entre os métodos encontram-se, essencialmente, na escolha das espécies de algas, nos métodos para a determinação da sua concentração, na composição dos meios de cultura e na forma de exprimir os resultados (tabela 2). As espécies recomendadas em ensaios de toxicidade são as algas verdes de água doce *S. capricornutum* e a *S. subspicatus*, ambas pertencentes à ordem *Chlorococcales*.

A principal vantagem da padronização dos ensaios é a possibilidade de comparação dos resultados entre laboratórios do mundo inteiro. Porém, os métodos padronizados diferem, por exemplo, nos métodos de determinação da concentração da alga, nas concentrações de inóculo, no controle do pH, etc. (tabela 2).

Quanto aos métodos sugeridos para a determinação da concentração da alga, a norma ISO 8692 recomenda que a medida seja feita no mínimo uma vez ao dia por contagem de partículas, microscopia, turbidez, fluorescência ou absorvância. Entretanto, a agência de proteção ambiental americana - U.S. EPA recomenda a medida diária de biomassa nos 5 primeiros dias de crescimento da alga, pela determinação de massa seca ou pelos mesmos métodos recomendados pelas normas internacionais (APHA, 1992).

Os dois métodos oficiais de ensaios de toxicidade com a alga verde *S. subspicatus* recomendados pelo Instituto Alemão de Normas (DIN 38412 Teil 9 e Teil 33) diferem, principalmente, quanto ao método de determinação da concentração da alga. Enquanto o primeiro (DIN 38412 - Teil 9) é semelhante aos métodos recomendados pela ISO e EN, os quais medem a área de crescimento da

alga sob uma curva de crescimento em 72 horas, o segundo (DIN 38412 - Teil 33) mede a inibição da produção de clorofila *a* "in vivo" avaliada pela emissão de fluorescência em 685 nm.

Entretanto, vários autores alertaram para o fato de que o uso de diferentes parâmetros para avaliar o crescimento da alga pode fornecer diferentes respostas de toxicidade para uma mesma amostra e, nesse caso, não podem ser numericamente comparados entre si (Kühn e Pattard, 1990; Abdel-Hamid e col. 1993, Peterson e Nyholm, 1993; Caux e col., 1996; Dorgerloh, 1997).

Diferenças significativas entre os valores de CE50 foram encontradas por Abdel-Hamid e col. (1993), utilizando o ensaio de toxicidade com algas para avaliar a qualidade de água do Rio Nilo. Os autores verificaram que as medidas por contagem de células e determinação de massa seca foram mais sensíveis do que a determinação da área sob a curva de crescimento e do cálculo da taxa de crescimento.

Alguns pesquisadores criaram alternativas para a determinação da concentração de alga, tal como a medida da diferença da massa celular inicial e final das algas imobilizadas em alginato (Abdel-Hamid, 1993). Llanten e Greppin (1994) verificaram a toxicidade dos metais, zinco, cobre e chumbo sobre a alga *Chlorella rubences* determinando a variação do conteúdo de ATP por Ressonância Magnética Nuclear.

Quanto às formas de exprimir os resultados, o método descrito pela ISO menciona que o resultado de toxicidade pode ser obtido tanto pelo cálculo da área sob a curva de crescimento da alga, quanto pela determinação da sua taxa de crescimento diário num determinado período de tempo. Como forma de distinguir os resultados é recomendado que os valores de CE50 devem ser especificados como C_{bE50} , se baseados na área da curva de crescimento e como C_{rE50} , se baseados na taxa de crescimento da alga num determinado intervalo de tempo. Entretanto, do ponto de vista ecológico (dinâmica de populações) a taxa de crescimento é mais significativa, por representar o crescimento logarítmico de uma população da alga (Nyholm e Källqvist, 1989; Dorgerloh, 1997).

Tabela 2: Parâmetros usados por métodos oficiais de ensaios de toxicidade com as algas *S.subspicatus* e *S. capricornutum*

Método	Concentração inicial de células	Controle do pH	Iluminação	Medida da Concentração de alga	Resultado
ISO 8692 International Standard 1989	10^4 cels.mL ⁻¹	ajuste do pH da amostra à neutralidade é opcional, mas o pH não deve aumentar mais de 1,5 unidades durante o ensaio	luz branca $35-70 \times 10^{18}$ fótons.m ⁻² .s ⁻¹ ou 6000-10000 Lux	contagem de partículas, microscopia, turvação, fluorescência ou absorvância	cálculo da área sob a curva de crescimento da alga ou inibição da taxa de crescimento em 3 dias e cálculo de CE50 e CENO
ABNT Associação Brasileira de Normas técnicas (NBR 12648) 1992	10^4 a 10^5 cels.mL ⁻¹	ajuste do pH da amostra à neutralidade	não menciona o tipo de lâmpada 5000 Lux ($\pm 10\%$)	contagem de partículas, microscopia, turvação, fluorescência ou absorvância	inibição do crescimento após 96 horas
EPA Environmental Protection Agency 1989	10^3 cels.mL ⁻¹	pode chegar no máximo até 8,5, mantido pela agitação dos frascos testes a 100 rpm	luz branca fluorescente 4304 Lux ($\pm 10\%$) limite mínimo: 2152 Lux ($\pm 10\%$)	determinação da massa seca (principalmente), microscopia, turvação, espectroscopia ou outro método apropriado	cálculo da área sob a curva de crescimento da alga ou inibição da taxa de crescimento em 5 dias e cálculo de CE50 e CENO
DIN 38412 Teil 9 Deutsches Institut für Normung 1992	10^4 cels.mL ⁻¹	o pH não é controlado	luz branca universal e intensidade entre 8000 e 10000 Lux	idem ISO	idem ISO
DIN 38412 Teil 33 Deutsches Institut für Normung 1992	10^4 cels.mL ⁻¹	ajuste do pH da amostra à neutralidade o qual não deve aumentar mais de 1,5 unidades durante o ensaio	Idem DIN 38412 Teil 9	medida da fluorescência da clorofila <i>a</i> ($\lambda_{ex435nm}$ e $\lambda_{ex685nm}$) antes e após 72 horas de crescimento	cálculo da inibição da fluorescência da clorofila <i>a</i> em relação ao controle

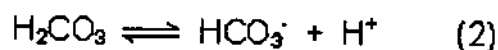
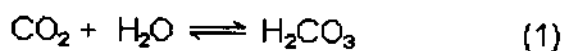
Uma estratégia fundamental usada pelos testes de toxicidade é a tentativa de reproduzir em laboratório as condições naturais em que vivem os organismos-teste, para indicarem, com a maior fidelidade possível, os efeitos tóxicos sobre estas espécies (Arensberg e col., 1996). Nesse ponto, localiza-se um dos maiores problemas encontrados, tanto na realização do ensaio com algas, como com outros organismos. Segundo Peterson e Nyholm (1993), as restrições que o sistema-teste impõe à avaliação da toxicidade devem ser cuidadosamente avaliadas antes que sejam estabelecidos protocolos para o uso dos mesmos.

Os fatores ambientais, representados por parâmetros físico-químicos da água, como o pH, a temperatura, a dureza e a concentração salina, vêm recebendo alguma atenção nos últimos 10 anos para a realização dos ensaios com algas, mas os protocolos oficiais ainda não especificam adequadamente esses problemas (Peterson e Nyholm, 1993).

• pH

Um ponto muito discutido são as mudanças do pH durante a realização do ensaio com algas. Considerando que o pH de águas naturais varia, normalmente, entre 6 e 9, essa faixa deve ser observada durante a realização do ensaio com algas (Kohl e Nicklisch, 1988). Porém, o pH do meio onde é realizado o teste pode sofrer alterações devido ao metabolismo das algas, as quais requerem CO_2 como fonte de carbono para a realização da fotossíntese.

Em meios aquosos naturais, a incorporação de CO_2 ocorre pela precipitação atmosférica (chuvas), pela oxidação da matéria orgânica provocada pela atividade metabólica dos organismos heterótrofos e pela hidratação do CO_2 do ar atmosférico, sendo que as diferentes formas de carbono encontram-se em equilíbrio, segundo as seguintes equações:



A forma predominante do CO_2 se apresentar no meio depende do pH do mesmo, sendo que em pH ácido é encontrado em maior abundância na forma de CO_2 . Aproximadamente entre pH 7 e 10, encontra-se quase apenas na forma de bicarbonato, enquanto que acima de pH 10 apresenta-se, na maior parte, como carbonato.

Em meios aquosos o CO_2 apresenta-se em sua maior parte como HCO_3^- , sendo que algumas espécies de plantas e algas, como a espécie *Scenedesmus*, possuem a capacidade de utilizar, além do CO_2 , o HCO_3^- , como fonte de carbono para a realização da fotossíntese. Nestas algas, o HCO_3^- é transportado para dentro da célula onde é convertido a CO_2 pelo deslocamento (para a esquerda) das equações 1 e 2 acima descritas. A desidratação do H_2CO_3 a CO_2 é catalisada pela enzima intracelular anidrase carbônica, e o CO_2 liberado pode ser usado na fotossíntese. Para balancear a entrada de HCO_3^- a alga excreta OH^- (proveniente da dissociação da H_2O) provocando um aumento do pH do meio externo (Kirk, 1994).

No ensaio com algas, o CO_2 requerido pela alga pode ser proveniente da atmosfera pela dissolução do CO_2 promovida pela agitação dos frascos-teste ou pelo consumo de carbono inorgânico o qual é adicionado ao meio de cultura na forma de Na_2CO_3 ou NaHCO_3 (Kohl e Nicklisch, 1988).

Durante a fase exponencial de crescimento, o consumo de CO_2 pela alga é tão intenso que a concentração de CO_2 proveniente da atmosfera nem sempre é suficiente. Nesse caso, parte do carbono consumido será derivado do carbonato ou bicarbonato presente no meio, o que provocará um aumento do pH (Peterson e Nyholm, 1993). O aumento excessivo do pH resulta no prejuízo da própria espécie, pois em pH alcalino o carbono encontra-se na forma de carbonatos insolúveis (equação 3) e portanto não disponível à alga.

Além da desvantagem fisiológica da alga em relação ao aumento excessivo do pH, a manutenção do pH durante a realização do ensaio também é importante, pois a toxicidade de algumas substâncias químicas, principalmente de metais, como previamente mencionado no item I, está estreitamente relacionada com o pH do meio no qual elas se encontram (Caux e col., 1996; Kiefer e col., 1997).

O pH do meio interfere na especiação dos metais, a qual refere-se às diferentes formas físico-químicas que o metal apresenta. Por exemplo, com o aumento do pH, formam-se espécies de complexos hidroxilados os quais apresentam toxicidades diferentes do respectivo cátion. Geralmente, em meio ácido, o metal existe como cátion livre e, em meio alcalino, pode ocorrer a formação de hidróxidos insolúveis diminuindo a disponibilidade e a toxicidade do metal. Esse efeito foi verificado por Novaha e col. (1995) quando compararam a toxicidade das concentrações totais de metais encontradas num efluente com as toxicidades individuais dos mesmos à bactéria *P. phosphoreum* (*V. fisheri*). Os pesquisadores inferiram uma alta toxicidade ao efluente com base na elevada concentração de alumínio encontrada no mesmo. Porém, o efluente apresentou uma baixa toxicidade à bactéria a qual foi atribuída ao pH no qual o ensaio foi realizado, entre 7,0 e 7,5, onde o metal é encontrado, em sua maior parte, na forma de hidróxido insolúvel ($\text{Al}(\text{OH})_3$) e conseqüentemente incapaz de penetrar nas membranas da bactéria.

Fenômenos como a complexação ou adsorção de metais à matéria orgânica, como as substâncias húmicas, ou à inorgânica como carbonatos e hidróxidos também são regidos pelo pH (Kiefer e col., 1997, Pawlik-Skowronska e col. 1997).

Algumas estratégias têm sido adotadas para minimizar as alterações de pH durante a realização do ensaio de toxicidade com algas, tais como: a modificação da composição do meio de cultura (Peterson e Nyholm, 1993), a diminuição da densidade celular (relacionada com o inóculo) (Comber e col., 1995) e da duração do teste (Arensberg e col., 1996) e o aumento da superfície de troca de gases (Abalde e col., 1995). O uso de substâncias tamponantes também tem sido estudado (Keating e col., 1996), embora os protocolos oficiais do ensaio com algas ainda não comentem a necessidade de sua adição aos meios de cultura.

1.3- USO DO ENSAIO DE TOXICIDADE COM ALGAS PARA A AVALIAÇÃO DE "AMOSTRAS COLORIDAS"

Conforme descrito nos itens anteriores, o ensaio com algas vem sendo comumente utilizado para a avaliação do potencial tóxico de novos compostos químicos, para a determinação da qualidade de águas superficiais e na avaliação da toxicidade de efluentes industriais. Considerando esse amplo espectro de aplicações do ensaio, pode-se esperar que as amostras a serem avaliadas possuam as mais diversas características físico-químicas. Na prática, é observado que amostras de diferentes naturezas apresentam, freqüentemente, características diferentes como por exemplo diferenças no pH, distintas concentrações de nutrientes e diferentes colorações.

A possibilidade de que amostras coloridas sejam avaliadas pelo ensaio de toxicidade com algas é muito pouco abordada na literatura, apesar dessa característica poder ser encontrada, tanto em águas de ambientes naturais (pantanosas), quanto em efluentes industriais (papeleiro, têxtil, etc.).

No caso específico de amostras de águas de ambientes naturais, a coloração escura das águas está relacionada com a elevada concentração de carbono orgânico dissolvido encontrado em determinados corpos d'água. A concentração de carbono orgânico dissolvido nas águas consideradas escuras, dentre as quais encontram-se as águas de pântanos, varia entre 5 e 50 mg C.L⁻¹ sendo as principais substâncias responsáveis pela coloração escura destas águas denominadas de substâncias húmicas (SH) (MacCarthy e Suffet, 1989).

O termo substâncias húmicas refere-se ao material orgânico presente no meio ambiente resultante da decomposição de resíduos de plantas e animais e da atividade metabólica de microorganismos, o qual não pode ser classificado como gordura, polissacarídeo ou proteína (MacCarthy e Suffet, 1989).

No que diz respeito à coloração dos efluentes industriais, alguns autores observaram a formação de substâncias tipo-húmicas em sistemas de tratamento biológico, tanto de efluentes domésticos como industriais (DeWalle e Chian, 1974; Link e col., 1989; Dahlman e col., 1995; Agbekodo e col., 1997). Link e col. (1989) verificaram que substâncias recalcitrantes e escuras com elevada massa molecular

“semelhantes às SH” eram formadas durante o processo de tratamento biológico de efluentes a partir de substratos de baixa massa molecular. Da mesma forma, Dahlman e col. (1995) constataram a presença de substâncias com massa molecular elevada em efluentes de indústria papaleira. A caracterização química dessas substâncias por métodos como Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa revelou o seu alto grau de aromaticidade e a sua semelhança com as SH aquáticas.

Além da possibilidade de que a coloração de efluentes seja causada por moléculas orgânicas de alta massa molecular, existem efluentes, como os de indústrias têxteis, que apresentam coloração devido aos próprios corantes usados no processo industrial (Banat e col., 1996).

Sabendo-se que as algas absorvem energia luminosa para a realização da fotossíntese, supõe-se que a luz fornecida às algas durante a realização do ensaio de toxicidade, pode ser parcialmente absorvida pelas substâncias coloridas componentes de águas superficiais e efluentes (Kohl e Nicklisch, 1988).

Na figura 3, está representada a influência da irradiação no crescimento de plantas e algas verdes, a qual pode ser tipicamente demonstrada por uma curva de saturação de luz. A produção primária, ou seja, a fotossíntese aumenta com o aumento da irradiação até um valor de saturação. Na faixa de saturação de luz, a taxa de fotossíntese, ou seja, o crescimento das plantas, permanece constante mesmo com o aumento da irradiação. Após a faixa de saturação de luz, aumentando-se ainda mais a intensidade luminosa o sistema fotossintético pode ser danificado, diminuindo assim a taxa de fotossíntese (Schwoerbel, 1993).

Como pode ser observado na figura 3, a irradiação está diretamente relacionada ao crescimento das plantas e algas, o que explica a importância do fator luz na realização do ensaio de toxicidade com algas.

Os testes padronizados, conforme descrito na tabela 2 do item anterior (pg.14), estipulam o uso de luz com a distribuição espectral do tipo "branca universal" (espectro apresentado no anexo III) e luminosidades que variam de 6000 a 10000 Lux para a realização do ensaio. Porém, esses testes não consideram a possibilidade de que amostras coloridas sejam avaliadas. Nesse caso, a cor

apresentada pelas amostras poderia absorver parte da luz emitida, diminuindo assim a luz disponível para a realização da fotossíntese pelas algas.

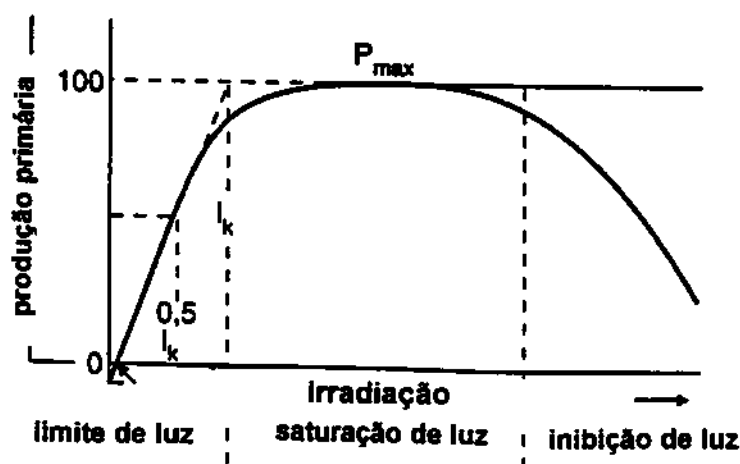


Figura 3: Relação entre irradiação e produção primária (Schwoerbel, 1993).

Levando-se em consideração os fatores acima descritos, o ensaio com algas, como é realizado normalmente, não permite diferenciar se o efeito causado por amostras "coloridas" é um efeito tóxico real, ou, simplesmente, se a luz fornecida às algas para o seu crescimento durante a realização do ensaio é, em parte, absorvida por estas amostras. Na literatura são raros os trabalhos que especificam esse tipo de dificuldade. As pesquisas para solucionar tal problema são, normalmente, realizadas por indústrias que possuem interesse comercial no assunto, como é o caso da indústria de corantes.

Um exemplo disto é a pesquisa patrocinada pela associação dos fabricantes de tintas e pigmentos orgânicos, ou a "Ecological and Toxicological Association of Dyes and Organic Pigments Manufacturers - ETAD" para investigar o efeito tóxico real de corantes *versus* o efeito de absorção da luz. A toxicidade de 10 corantes foi avaliada por uma bateria de ensaios. Os 10 corantes testados apresentaram uma toxicidade muito baixa (CE ou CL50 > 100 mg.L⁻¹) sobre peixes, daphnias e bactérias enquanto que, para o ensaio com a alga *S. subspicatus* foram encontradas toxicidades bem mais elevadas (CE50 entre 0,83 a 41 mg.L⁻¹). Esses resultados sugeriram que a inibição do crescimento da alga fosse devido, não apenas à toxicidade inerente aos corantes, mas também, ao efeito indireto da luz.

Nesse sentido, foi proposta uma modificação do método com algas que consistiu num controle para eliminar o efeito da absorção da luz pelos corantes. A utilização do ensaio modificado detectou que 65 a 94 % da inibição do crescimento da alga era efeito de absorção da luz (ETAD, 1994).

Comber e col. (1995) também tentaram solucionar o mesmo problema. Os autores propuseram o aumento da intensidade luminosa para a avaliação da toxicidade de substâncias coloridas, a diminuição do volume do teste de 100 para 30 mililitros e a diminuição do inóculo de 10^4 para 10^3 células.mL⁻¹. Nessa investigação foram comparados os resultados de toxicidade do dicromato de potássio e do 3,5 ditorofenol à *S. subspicatus*, aumentando-se a intensidade luminosa de 8000 para 16000 Lux. Os autores confirmaram que a absorção da luz pelas amostras diminuiu o crescimento da alga, entretanto, esse efeito não pôde ser quantificado e não foi confirmado se o método proposto eliminou totalmente o efeito.

Outro fator a ser levado em consideração quando se trabalha com amostras coloridas é o método escolhido para a determinação da concentração da alga. Alguns dos métodos sugeridos são óticos, como por exemplo a espectrofluorimetria e a espectrofotometria, podendo sofrer a interferência pela presença de partículas, turvação e substâncias coloridas nas amostras. Nesse sentido, o ensaio com alga sugerido pela OECD (1984) observa que: "o protocolo não pode ser usado para a determinação da toxicidade de amostras contendo substâncias que interfiram diretamente na medida da concentração da alga". Uma observação semelhante é descrita pelo método alemão (DIN 38412 - Teil 33) o qual utiliza fluorescência para a determinação da clorofila a, advertindo que turvações e colorações apresentadas pelas amostras podem interferir na medida da concentração da alga.

Porém, na prática, tais observações, ou pelo fato de serem muito vagas ou pela falta de uma alternativa concreta para o método, nem sempre são levadas em consideração. Prova disso, é que o ensaio com algas, segundo a norma internacional (ISO 8692) vigente, não faz nenhuma restrição a respeito da coloração das amostras.

OBJETIVOS GERAIS DO TRABALHO

De posse das informações obtidas na literatura, com as quais constatou-se a existência de inúmeras questões relativas à utilização de ensaios de toxicidade na avaliação do potencial tóxico de efluentes, foram estabelecidos os objetivos gerais desse trabalho:

- 1- avaliar métodos padronizados para a realização do ensaio com a alga *S. subspicatus* quanto a alguns parâmetros, como os métodos propostos para a medida da concentração da alga, as condições do inóculo, os meios de cultura e as alterações do pH ocorridas durante o ensaio;
- 2- realizar um estudo de toxicidade de efluentes industriais pela comparação dos resultados obtidos por métodos físico-químicos e ensaios de toxicidade com organismos de diferentes níveis tróficos;
- 3- avaliar as limitações do uso do ensaio de toxicidade com a alga *S. subspicatus* relacionadas à coloração escura característica de alguns efluentes industriais e águas de ambientes naturais. Se possível, propôr uma modificação para o método avaliado.

II - MATERIAIS E MÉTODOS

II.1- AVALIAÇÃO DO ENSAIO DE TOXICIDADE COM A ALGA *S. SUBSPICATUS*

II.1.1- Ensaio com alga

a) **Cultura da alga:** como organismo indicador foi utilizada a alga verde de água doce, *Scenedesmus subspicatus* (cepa número 8681 SAG) adquirida na coleção de culturas de algas do "Pflanzenphysiologisches Institut" localizado em Göttingen na Alemanha.

A cultura da alga recebida em meio sólido, foi transferida com auxílio de alça de platina, sob condições estéreis, para um Erlenmeyer de 125 mL contendo 30 mL de meio de cultura líquido (composição do meio ISO descrita no anexo I). Essa cultura da alga, denominada de pré-cultura, cresceu no meio por volta de 14 dias sob intensidade luminosa entre 6000 e 8000 Lux (Votcraft Luxmeter FX - 101) sob agitação constante (100 rpm) e temperatura de 23 °C. Após este período, retirou-se 0,5 mL da pré-cultura em condições estéreis para inocular uma nova cultura, servindo esta de inóculo para o ensaio de toxicidade, após 3 dias de crescimento sob as mesmas condições da pré-cultura.

A concentração inicial da alga para o ensaio foi obtida pela leitura da absorvância ou fluorescência da suspensão de alga a qual foi diluída, quando necessário, para obter a concentração inicial de alga desejada. A absorvância e a fluorescência foram correlacionadas com a contagem do número de células (item II.1.2).

b) **Condições do ensaio:** as vidrarias necessárias para a realização deste ensaio foram previamente lavadas com HCl 10 % seguida de enxágüe (mínimo 7 vezes com água deionizada) para a remoção total de possíveis traços de nutrientes.

Todas as amostras de efluentes ou águas naturais a serem analisadas foram previamente filtradas em membrana de acetato-celulose 0,45 μm (Sartorius) sob pressão (3 bar).

Os ensaios foram realizados em Erlenmeyers de 125 mL aos quais adicionou-se: amostra em diferentes diluições, meio de cultura, e, uma quantidade definida de alga (inóculo). Os ensaios foram realizados em triplicata para cada diluição da amostra, sendo que o volume final em todos os Erlenmeyers foi de 30 mL, conforme o esquema apresentado na tabela 3.

Tabela 3: esquema para a realização do ensaio de toxicidade com a alga *S.subspicatus*.

Diluição da amostra	Amostra (mL)	Água deionizada (mL)	Meio de cultura (mL)	Inóculo 10^6 células. mL^{-1} (mL)	Volume final do teste (mL)
1:1,15	26,0	0	3,0	1,0	30,0
1:2	15,0	11,0	3,0	1,0	30,0
1:3	10,0	16,0	3,0	1,0	30,0
1:4	7,5	18,5	3,0	1,0	30,0
1:6	5,0	21,0	3,0	1,0	30,0
1:8	3,75	22,25	3,0	1,0	30,0
1:12	2,5	23,5	3,0	1,0	30,0
controle	-	26,0	3,0	1,0	30,0

A concentração inicial de alga em cada Erlenmeyer foi determinada logo após a realização do inóculo. Os métodos utilizados para esta determinação foram normalmente a medida da absorvância em 680 nm e fluorescência em 685 nm (os diferentes métodos serão discutidos no item II.1.2). Os Erlenmeyers foram então incubados em banhos termostatizados (Julabo SW 20C) à temperatura de 23°C sob agitação (100 rpm).

A fonte luminosa necessária ao crescimento da alga foi fornecida por lâmpadas do tipo branca universal (OSRAM) situadas, aproximadamente, 40 cm acima dos banhos termostatizados. Normalmente, utilizou-se a faixa de luz entre 6000 e 8000 Lux. Após 72 horas foi realizada novamente uma medida da concentração da alga no controle e nas diferentes diluições da amostra.

c) Resultado do ensaio: foi expresso segundo a norma ISO 8692 (ISO, 1989) determinando-se a taxa de crescimento diário das algas (μ) conforme descrito a seguir:

$$\mu = \frac{[(\ln E_{72}) - (\ln E_0)] \times 24}{t_n}$$

onde:

μ = taxa de crescimento diário da alga

E_0 = medida da concentração da alga no tempo zero

E_{72} = medida da concentração da alga após 72 horas

t_n = 72 horas

No caso de amostras tóxicas, a taxa de crescimento diário (μ) da amostra foi menor que o μ do controle. A toxicidade das amostras foi representada em termos de porcentagem de inibição do crescimento das algas em relação ao controle, calculada conforme descrito a seguir.

$$I\mu = \frac{\mu_c - \mu_i}{\mu_c} \times 100$$

onde:

$I\mu$ = % inibição da taxa de crescimento

μ_i = média da taxa de crescimento da alga em cada diluição da amostra

μ_c = média da taxa de crescimento da alga no controle

O resultado do ensaio de toxicidade com alga foi obtido por interpolação das curvas concentração-resposta e expresso como concentração efetiva 50 ou 20 (C_{E50} e C_{E20}), ou seja, como a concentração da amostra ($v.v^{-1}$) que apresentou 50 ou 20% de inibição da taxa de crescimento da alga, respectivamente. As estimativas das médias de C_{E50} e 20 e seus intervalos de confiança foram calculados pela análise de variância entre as repetições das diluições utilizando o

programa PROCGLM do SAS®. Para comparar as CE50 e 20 de diferentes amostras foi utilizado o teste de Tukey disponível no SAS® (SAS/STAT, 1989).

Como padrão positivo de toxicidade foi usado CuCl_2 na concentração de $0,6 \text{ mg.L}^{-1}$ de cobre total, o qual inibiu 50-70 % o crescimento da alga. Caso necessário, foi feito um controle contendo amostra em todas as diluições usadas no teste, sem a adição da alga.

II.1.2 Métodos para medida da concentração da alga

Foram utilizadas as medidas de absorvância e fluorescência, a extração de clorofila, a determinação de massa seca e a contagem de células para a determinação da concentração da alga. A correlação entre estes métodos foi verificada tanto para baixas concentrações de células como para altas com o auxílio de regressão linear realizada com o programa de computador Excel 5.1.

As culturas de alga utilizadas para estas determinações foram cultivadas por 3 dias conforme descrito no item II.1.1 a.

a) Medida da absorvância: em Espectrofotômetro Cadas 100, (Dr. Lange) onde o pico máximo de absorção da alga em 680 nm foi utilizado como medida do crescimento.

b) Determinação da fluorescência da clorofila *a in vivo*: o equipamento utilizado foi um fluorímetro Shimadzu RF - 551 no qual mediu-se a fluorescência da clorofila *a* sendo o comprimento de onda de excitação em 435 nm e a emissão medida em 685 nm. Os testes nos quais a fluorescência foi usada para a medida da concentração da alga foram realizados no "Niedersächsisches Landesamt für Ökologie - NLÖ - Hildesheim Alemanha".

c) Extração de clorofila: o método de extração de clorofila utilizado é descrito pelas normas alemãs ("DIN 38412 - Teil 16"). As culturas de alga foram filtradas em filtros de fibra de vidro GF 6 (Schleicher & Schuell), sendo esses recortados em pequenas tiras e colocados em frascos âmbar com 10-20 mL de etanol 96% (Merck). Os frascos permaneceram em ambiente escuro

por 24 horas a 4 °C sendo agitados esporadicamente. Após este período, foi feita uma nova filtração em funil de Büchner acertando-se o volume do extrato alcoólico com etanol para 50,0 mL. A determinação da concentração de clorofila foi feita medindo-se a absorvância do extrato alcoólico em 665 nm.

Para evitar que produtos da degradação da clorofila *a*, principalmente os feopigmentos, os quais absorvem próximos ao comprimento de onda da clorofila *a* interfiram na determinação, o extrato alcoólico foi acidificado com 0,5 mL de HCl 1,0 mol L⁻¹ fazendo-se em seguida uma nova leitura da absorvância em 665 nm. O cálculo para a determinação da concentração da clorofila *a* foi feito conforme a fórmula a seguir:

$$\beta_c = (A_v - A_n) \times \frac{R}{R - 1} \times \frac{V_E}{V_p \cdot d} \times \frac{10^3}{\alpha}$$

onde:

β_c = concentração de clorofila *a* em ug.L⁻¹

A_v = absorvância do extrato alcoólico em 665 nm antes da acidificação

A_n = absorvância do extrato alcoólico em 665 nm após a acidificação

$R = 1,7$. Relação de $A_v : A_n$ para a clorofila *a* pura

V_E = volume do extrato alcoólico, em mL

V_p = volume da suspensão de algas, em L

d = espessura do caminho ótico, em cm

$\alpha = 82$. Coeficiente de absorção específica para a clorofila *a*

d) Determinação da massa seca das algas: 10,0 mL de suspensão de algas foi filtrada em filtro de acetato-celulose (Sartorius) com porosidade de 0,2 μ m (pesado após 2 horas à 105°C e resfriado). A diferença de massa do filtro inicial e final foi relacionada como o número de células por mililitro.

e) Contagem do número de células: para esta determinação foi utilizada câmara de Bürker. Essa câmara é dividida em 9 quadrados, os quais são novamente divididos em 12 quadrados com área de 1/25 mm². A altura

da câmara é de 0,1 mm. Com o auxílio de um microscópio ótico (Carl Zeiss) foram contadas as células presentes em 12 quadrados pequenos situados diagonalmente. O tamanho das algas foi aumentado 320 vezes. O cálculo do número de células foi feito conforme a fórmula a seguir:

$$\text{células.}\mu\text{L}^{-1} = \frac{C}{A \times H}$$

onde:

C= média do número de células contadas nos 12 quadrados diagonais

A= área contada

H= altura da câmara

II.1.3 Estudo do inóculo no ensaio de toxicidade

Foram inoculadas $1,7 \times 10^6$ células.mL⁻¹ em controles (ver tabela 3) retiradas de uma mesma cultura de *S. subspicatus* entre o 2º e 6º dias de crescimento da alga. O crescimento da alga foi medido após 72 h pela leitura da absorvância em 680 nm.

Para avaliar o efeito da concentração do inóculo no crescimento da alga foi adicionado em controles 1,0 mL de diferentes concentrações de alga, as quais encontram-se apresentadas na tabela 4.

Tabela 4: concentrações de alga *S. subspicatus* utilizadas como inóculo

Absorvância do inóculo em 680 nm	Concentrações de alga inoculadas (10 ⁶ células.mL ⁻¹)	Concentração de alga no Erlenmeyer (10 ⁴ células.mL ⁻¹)
0,134	1,7	5,7
0,146	1,9	6,3
0,160	2,1	7,0
0,168	2,2	7,3
0,180	2,3	7,7

II.1.4 Manutenção do pH no teste de toxicidade com alga

Verificou-se o crescimento da alga *S. subspicatus* e as mudanças do pH em dois meios de cultura distintos, denominados de ISO e SCE (composições descritas no anexo I). Após os resultados deste experimento foram adicionadas diferentes substâncias tampão (tabela 5) ao meio de cultura SCE, sendo verificado o aumento do pH em relação ao pH inicial do meio e o efeito de diferentes concentrações dos tampões no crescimento da alga *S. subspicatus*.

Tabela 5: tampões adicionados ao meio SCE para a realização do ensaio de toxicidade

Substância tampão	Concentração utilizada no meio de cultura	pKa
Tampão HEPES (2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]-etanosulfonato)	3,5 - 17,5 mmol.L ⁻¹	7,5
Tampão TRIS (hidroximetil-aminometano)	0,41; 0,83 e 4,2 mmol.L ⁻¹	8,1
Tampão Cítrato	0,095 - 9,54 mmol.L ⁻¹	em torno de 5

II.2- ESTUDO DA TOXICIDADE DE EFLUENTES DE UMA INDÚSTRIA PRODUTORA DE PECTINA POR MÉTODOS FÍSICO-QUÍMICOS E ENSAIOS DE TOXICIDADE

II.2.1 Descrição da amostragem

Os efluentes estudados foram obtidos de uma indústria produtora de pectina localizada no norte da Alemanha. Foram coletadas amostras de diferentes etapas do sistema de tratamento de efluentes, conforme esquematizado na figura 4. A amostra 1 corresponde ao efluente da produção de pectina que entra no sistema de

tratamento de efluentes (STE). A amostra 2 e amostra 3 foram retiradas após a etapa de desnitrificação e tratamento anaeróbio do STE respectivamente. O efluente final, o qual seria descartado em corpos d'água, foi denominado de amostra 4.

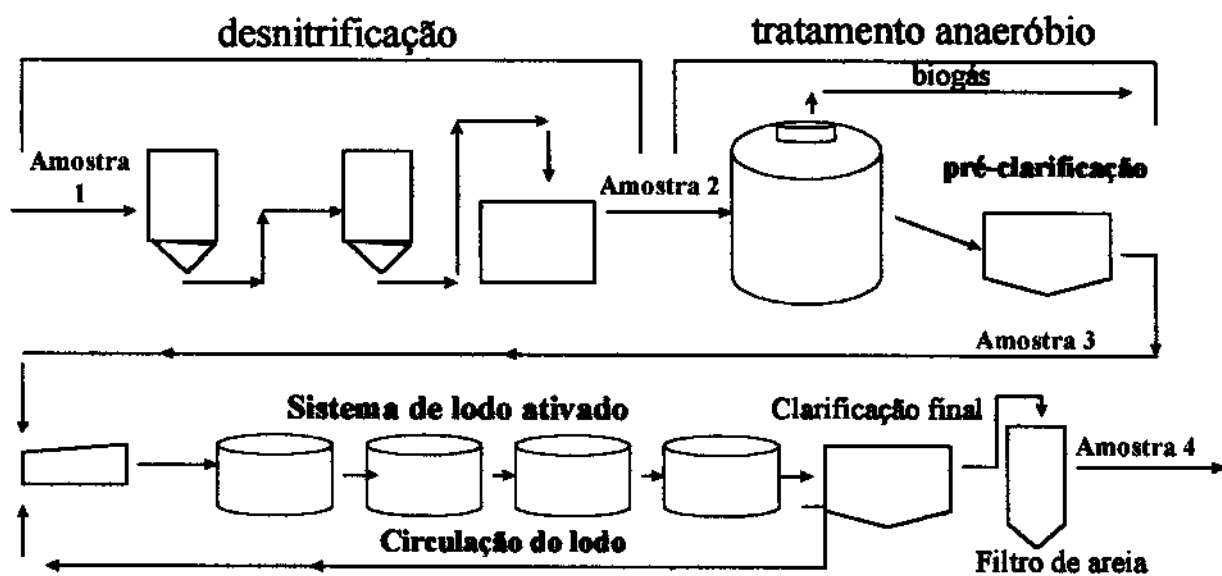


Figura 4: esquema da amostragem dos efluentes da indústria produtora de pectina.

II.2.2 Caracterização físico-química dos efluentes

Alguns dos parâmetros físico-químicos usados para a caracterização dos efluentes foram fornecidos pela própria indústria, sendo que os resultados apresentados foram uma média de, no mínimo, 5 amostragens realizadas em dias diferentes do mês de novembro de 1996. A medida do pH foi feita por um pH-metro marca WTW 522 e da condutividade por um condutímetro modelo 703 (Knick).

As análises feitas pela indústria foram realizadas com o auxílio de "Kits", os quais determinavam a concentração de $\text{NO}_3\text{-N}$ (teste LCK 339 - Dr. Lange), $\text{NO}_2\text{-N}$ (teste LCK 341 -Dr. Lange), $\text{NH}_4\text{-N}$ (teste Spectroquant 14752 Merck) e o $\text{PO}_4\text{-P}$ (Phosphor -Test PMB 14848 - Merck).

(teste LCK 341 -Dr. Lange), $\text{NH}_4\text{-N}$ (teste Spectroquant 14752 Merck) e o $\text{PO}_4\text{-P}$ (Phosphor -Test PMB 14848 - Merck).

O princípio do método para a determinação de $\text{NO}_3\text{-N}$ é a reação de íons nitrato em meio contendo ácido sulfúrico e fosfórico com 2,6-dimetilfenol formando 4-nitro-2,6-dimetilfenol.

Na determinação de $\text{NO}_2\text{-N}$, o nitrito reage com aminas aromáticas primárias em meio ácido formando sais diazo, os quais formam corantes azo com compostos aromáticos e são medidos em 525 nm.

A determinação de $\text{NH}_4\text{-N}$ envolve a formação de um composto intensamente azul, o indofenol, pela reação de amônio, hipoclorito e fenol, catalisada por um sal de manganês, o qual é determinado em 690 nm.

Os íons $\text{PO}_4\text{-P}$ formam com íons molibdato em solução de ácido sulfúrico ácido molibdofosfato, o qual será reduzido pelo ácido ascórbico a azul de fosfomolibdato, o qual é medido em 712 nm.

A concentração de cloretos totais foi determinada pela titulação da amostra com nitrato mercúrico, formando HgCl_2 solúvel, mas pouco dissociado. O excesso de titulante (Hg^{2+}) reage entre pH 2,3 e 2,8 com difenil carbazona, formando um complexo de cor roxa.

A cor das amostras foi determinada pela medida da absorvância em 436 nm, conforme recomendado pelo método ISO 7881 (ISO, 1994).

a) Demanda bioquímica de oxigênio - DBO_5

A demanda bioquímica de oxigênio foi determinada conforme a norma "DIN 38408 Teil 51". A DBO relaciona o conteúdo de matéria orgânica facilmente biodegradável na amostra e é determinada pela diferença da concentração de oxigênio dissolvido, antes e após a incubação das amostras a 20°C, no escuro, por 5 dias. A diferença na concentração de oxigênio dissolvido se deve ao consumo do substrato contido na amostra pelos microorganismos presentes na mesma. A medida da concentração de oxigênio foi feita com auxílio de eletrodo específico para medir O_2 (Knick). A diferença do consumo de oxigênio neste período, descontando-se o controle,

é a medida da demanda bioquímica de oxigênio em 5 dias (DBO_5) expressa como massa de oxigênio consumido por litro de amostra.

b) Medida de carbono orgânico total e carbono orgânico dissolvido COT/COD

Para a determinação de carbono orgânico dissolvido (COD) as amostras foram previamente filtradas em membrana ($0,45 \mu\text{m}$), enquanto que a concentração de carbono total foi determinada sem que as amostras fossem filtradas. Essas determinações foram realizadas em um equipamento Shimadzu TOC 5000 por intermédio da oxidação catalítica do carbono orgânico, em altas temperaturas, a CO_2 . A água da amostra é vaporizada e o carbono da amostra é transformado em CO_2 , o qual é transportado por intermédio de um gás carreador sendo a sua concentração detectada através de um analisador de infravermelho. Assim, é determinada a concentração de carbono total em mg.L^{-1} . O carbono inorgânico é medido separadamente e o orgânico total pela diferença dos valores obtidos. O carbono inorgânico é convertido a CO_2 pela injeção da amostra em uma câmara contendo esferas de quartzo revestidas com ácido fosfórico, sendo o produto da reação carreado e detectado da mesma forma descrita anteriormente.

c) Demanda química de oxigênio - DQO

A demanda química de oxigênio foi determinada conforme a norma alemã "DIN 38408-Teil 43". O método baseia-se na oxidação completa da matéria orgânica por dicromato de potássio à temperatura elevada e em meio ácido contendo catalisador. Em um Erlenmeyer foi colocado 50,0 mL de amostra e acrescentado 10,0 mL de solução de dicromato de potássio $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$, 1,0 g de sulfato de mercúrio II e 80,0 mL de ácido sulfúrico concentrado contendo 10 g.L^{-1} de sulfato de prata. A mistura foi aquecida à 180°C por 10 minutos. Após o resfriamento da mistura foi adicionada solução indicadora de ferroína (M/40) e feita a titulação do dicromato excedente com

solução de sulfato ferroso amoniacal até que a coloração azul-esverdeada da amostra mudasse para marrom-avermelhada.

A quantidade de dicromato que reagiu é equivalente à matéria orgânica presente no meio. O resultado foi expresso em termos de massa de dicromato consumido (mg) por litro de amostra.

II.2.3 Caracterização toxicológica dos efluentes

Uma bateria de ensaios de toxicidade usando diferentes organismos indicadores foi utilizada, quais sejam: o método respirométrico usando lodo ativado como indicador de toxicidade, Lumistox® (Dr. Lange) o qual utiliza a bactéria luminescente *Vibrio fischeri* (DIN 38412, Teil 34) e o teste de toxicidade com a alga *S.subspicatus* (metodologia descrita no item II.1.1).

a) Ensaio respirométrico com lodo ativado

Para este ensaio foi utilizado lodo ativado proveniente do tratamento biológico de efluentes domésticos da cidade de Hannover e a metodologia descrita por Mudrack e Kunst, 1991. O lodo ativado, contendo $3,0 \text{ g.L}^{-1}$ de substâncias secas (SS), foi aerado durante uma noite para obtenção de uma taxa de respiração constante da população de organismos antes de ser utilizado para a realização do teste. Após este período, o lodo foi transferido para frascos de 110 mL e, com auxílio de um agitador magnético colocado no frasco de reação foi possível a obtenção de uma medida de O_2 constante (oxímetro WTW-EO 190). O consumo de O_2 pelo lodo em função do tempo foi detectado por um registrador (Kipp & Zone) acoplado ao sistema conforme está representado na figura 3 (pág. 10).

Para avaliar o efeito da adição das amostras sobre a respiração do lodo foram adicionados diferentes volumes dos efluentes (1, 3, 7, 10 e 20 mL) com os pHs ajustados para $7,0 \pm 0,2$. A alteração, seja a inibição ou a estimulação da respiração do lodo, foi registrada como a quantidade de O_2

(mg) consumida em relação à concentração de substâncias secas orgânicas do lodo (biomassa) pelo período de uma hora.

- Determinação de substâncias secas e substâncias secas orgânicas

Filtros de papel (Schleicher & Schuell) foram secados em estufa à 105°C por 4 horas, resfriados em dessecador e pesados. Uma quantidade conhecida do lodo ativado (50,0 mL) foi filtrado em filtro de Büchner e os filtros foram novamente colocados em estufa à 105°C pelo período mínimo de 4 horas. Após este período, pesou-se os filtros novamente e a diferença de massa foi calculada como a concentração de substâncias secas (SS) por litro de lodo. Para a determinação de substâncias secas orgânicas (SSo) foi colocado 100,0 mL do lodo em um cadinho e aquecido até a temperatura de 500°C em mufla por duas horas. Após este período, o cadinho foi pesado, obtendo-se assim a concentração de substâncias inorgânicas do lodo. Pela diferença da concentração de substâncias inorgânicas e de substâncias secas totais obteve-se a concentração de substâncias secas orgânicas.

- b) Ensaio com bactérias luminescentes

Foi utilizado o sistema Lumistox ® (Dr. Lange GmbH), no qual o organismo-teste é a bactéria marinha *V. fischeri* NRLL-B 11177. Adicionou-se 0,2% p.v⁻¹ de cloreto de sódio à amostra a ser analisada e o pH foi ajustado para $7,0 \pm 0,2$. As bactérias-teste, fornecidas pelo fabricante do equipamento na forma liofilizada, foram ressuspensas em solução contendo glicerol por 15 min. à 15°C. Após este período, pipetou-se 0,5 mL da suspensão de bactérias em cubetas próprias para a realização do teste as quais foram deixadas em repouso por mais 15 min. Em seguida, foi feita a primeira medida da luminescência da solução das bactérias. As amostras foram diluídas conforme o esquema apresentado na tabela 6 e a cada cubeta contendo a suspensão de bactérias pré-aquecidas foi adicionado o mesmo volume de amostra.

Tabela 6: esquema de diluição das amostras para a realização do ensaio com bactérias luminescentes.

Concentração da amostra (% v.v ⁻¹)	Diluição da amostra	Diluição da amostra na cubeta de reação
100,0	sem diluição	1:2
66,6	1:1,5	1:3
50,0	1:2	1:4
33,3	1:3	1:6
25,0	1:4	1:8
16,7	1:6	1:12
12,5	1:8	1:16
8,3	1:12	1:24
6,2	1:16	1:32

Um controle foi feito contendo solução salina 2% p.v⁻¹ em lugar da amostra. O controle e as diferentes diluições de amostra foram incubados à 15°C por 30 min. e após este período, foi feita a medida da luminescência final das bactérias. A substância padrão de toxicidade foi o dinitrofenol (0,1% p.v⁻¹), sendo que este devia apresentar 40 a 60% de inibição da luminescência das bactérias. A toxicidade foi calculada como CE50 ou CE20 (concentração na qual a luminescência das bactérias diminuiu 50 e 20 %, respectivamente), por interpolação dos gráficos concentração-resposta. A estimativa das médias de CE50 e CE20 e seus intervalos de confiança foram calculados pelo mesmo programa usado no ensaio com alga.

• Correção de cor para o ensaio com bactérias luminescentes

Para amostras que apresentaram coloração escura foi feita uma correção de cor. Uma cubeta especial composta de dois compartimentos, ou seja, uma espécie de cubeta dupla foi utilizada para a correção de cor. Ao compartimento interno (uma cubeta aproximadamente duas vezes mais estreita que a normal) foi adicionada a solução de bactérias (ressuspendidas conforme o item anterior). O compartimento externo apresenta o mesmo diâmetro que uma cubeta normal e nele foi adicionado a amostra diluída (1:2), a fim de simular a diluição que ocorre quando 0,5 mL da solução de

bactérias é colocada em contato com 0,5 mL de amostra. Uma cubeta dupla contendo água destilada em vez de amostra no compartimento externo foi utilizada para zerar o aparelho. O valor obtido em percentagem de inibição da luminescência representa a inibição pela qual a cor da amostra é responsável. Este valor foi subtraído do resultado original obtido.

II.2.4- Distribuição da massa molecular dos efluentes

O gel Sephadex G-50 (Pharmacia) foi preparado em água deionizada e equilibrado com solução tampão citrato 0,1 mol.L⁻¹ (pH=6) em coluna de vidro (50 x 2,5 cm). Para a calibração da coluna foram utilizadas soluções de 1,0 mg.L⁻¹ dos seguintes padrões compostos (Sigma) com massas moleculares conhecidas: dextrana azul (2000 kD), quimotripsinogênio (25 kD), mioglobina (18 kD), vitamina B12 (13,5 kD) e citocromo C (13,0 kD). As proteínas foram eluídas com o mesmo tampão utilizado para equilibrar a coluna. Frações de 6,0 mL provenientes da coluna foram recolhidas sendo medidas as absorvâncias em 280 nm de cada fração.

Os efluentes foram aplicados à coluna (volume 0,5 mL) e eluídos com o mesmo tampão utilizado para equilibrar a coluna. A distribuição das massas moleculares dos efluentes foram determinadas por interpolação em um gráfico contendo o logaritmo da massa molecular dos padrões contra seus K_{av} . Os K_{av} foram determinados conforme a fórmula a seguir:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

onde:

K_{av} = fração da fase estacionária disponível para a dispersão do soluto

V_e = volume de eluição para cada molécula

V_o = volume de eluição usado para o padrão dextrana azul

V_t = volume total da coluna

II.2.5- Caracterização dos efluentes por pirólise-cromatografia gasosa - espectrometria de massa (Pi-CG-EM)

Massas de aproximadamente 1,0 mg dos efluentes liofilizados, foram analisados em um sistema de pirólise-cromatografia gasosa acoplado a espectrometria de massa. O equipamento utilizado foi um pirolisador infra-vermelho (Pyro 2 Aa) acoplado a um cromatógrafo a gás (Shimadzu 17 A) e um espectrômetro de massa (Shimadzu QP 5000).

A pirólise foi realizada a temperatura de 700°C por 30 segundos e os produtos da pirólise passaram imediatamente para o cromatógrafo a gás, sendo que a temperatura do injetor foi 280 °C. Para a cromatografia gasosa foi utilizada uma coluna apolar composta de sílica com 5% de fenilpolisilfenilenosiloxano (coluna tipo BPX-5, SGE), medindo 48 m de comprimento e 0,32 mm de diâmetro interno. A temperatura do forno foi mantida a 60°C por 5 minutos sendo elevada 8°C. min⁻¹ até alcançar 320 °C mantida por 10 minutos. Hélio foi utilizado como gás de arraste a uma taxa de 1,1 mL.min⁻¹. O espectro de massa foi obtido a 1,4 kw realizando-se um scan de cada composto entre 40 e 400 m/z (1 scan.s⁻¹). Os produtos de pirólise obtidos foram identificados comparando-se os espectros dos compostos obtidos com os espectros padrões na biblioteca do SNIST (Standard Nacional Institut for Science and Technology), disponível como software no equipamento. As áreas dos picos foram expressas como área relativa e comparadas, entre si.

II.3- USO DO ENSAIO DE TOXICIDADE COM ALGA PARA AVALIAÇÃO DE EFLUENTES E ÁGUAS DE AMBIENTES NATURAIS DE COLORAÇÃO "ESCURA"

II.3.1- Amostragem

Para este estudo foram utilizadas amostras de efluentes industriais coletados após a última etapa do sistema de tratamento de efluentes de indústria produtora de papel e de indústria produtora de pectina (ambas localizadas no norte da Alemanha). Também foram utilizadas amostras de águas naturais (pântanos), além

de amostra de chorume (diluído 1:16) apresentando coloração escura. Como padrão de cor para as amostras estudadas, foram utilizadas soluções de substâncias húmicas comerciais (Roth e Fluka), conforme apresentado na tabela 7.

Tabela 7: amostras utilizadas para o estudo da influência da cor no ensaio de toxicidade com a alga *S. subspicatus*.

Amostra	Observações
solução de substâncias húmicas comerciais 0,2, 0,1 e 0,05 g.L ⁻¹ (Roth)	amostra utilizada em diferentes concentrações como padrão de cor
solução de humato de sódio 0,2, 0,1 e 0,05 g.L ⁻¹ (Roth)	amostra utilizada em diferentes concentrações como padrão de cor
efluente de indústria produtora de pectina	amostra coletada após a última etapa do sistema de tratamento de efluentes
efluente de indústria produtora de papel	amostra coletada após a última etapa do sistema de tratamento de efluentes
água de pântano I	amostra de pântano sem influência antropogênica em área de proteção ambiental (Rhauderfehn)
água de pântano II	amostra de pântano sem influência antropogênica em área de proteção ambiental (Bissendorf)
lixívia de resíduos sólidos (chorume diluído 1:16)	amostra obtida da planta de tratamento de resíduos sólidos urbanos (Hannover)

II.3.2- Determinação de cor

A determinação de cor das amostras utilizadas foi feita conforme descrito pelas norma ISO 7887 (ISO, 1994), pela leitura da absorvância das amostras em 436 nm, após filtração em membrana acetato-celulose com porosidade de 0,45 µm em pH em torno da neutralidade e temperatura ambiente.

II.3.3- Caracterização espectrofotométrica dos efluentes

A caracterização espectrofotométrica das amostras foi feita após a filtração em membrana de acetato-celulose (Sartorius) com porosidade de 0,45 μm . Os espectros de absorção UV-Vis de varredura foram feitos entre os comprimentos de onda de 200 e 700 nm em espectrofotômetro Cadas 100 (Dr. Lange).

II.3.4- Crescimento da alga sob diferentes distribuições espectrais de luz

Foram utilizadas luz branca universal e luz diurna OSRAM e intensidades luminosas que variaram entre 2000 e 9500 Lux.

II.3.5- Influência da cor das amostras na diminuição da oferta de luz para o crescimento da alga

Foram estudadas intensidades luminosas entre 2000 e 11000 Lux e luz do tipo branca universal (OSRAM).

Para a obtenção das diferentes intensidades de iluminação, o aparato luminoso móvel, localizado acima dos banhos termostatizados, foi afastado ou aproximado dos Erlenmeyers-teste. As medidas das intensidades luminosas foram feitas com auxílio de um Luxímetro na altura da lâmina d'água, exatamente no centro de cada um dos lugares do banho termostatizado onde os Erlenmeyers-teste permaneceram pelo período de realização do teste. Para cada amostra foi feito um controle (sem alga) em cada intensidade luminosa. O procedimento do teste foi seguido conforme item II.1.1 e as taxas de crescimento da alga determinadas após 72 h de crescimento.

III- RESULTADOS E DISCUSSÕES

III.1- AVALIAÇÃO DO ENSAIO DE TOXICIDADE COM A ALGA

S. SUBSPICATUS

No mundo inteiro, realiza-se o ensaio que utiliza alga como organismo indicador de toxicidade, com algumas alterações, sendo algumas delas referentes às condições de crescimento da alga e à interpretação dos resultados do ensaio. Os assuntos abordados nesse item foram originados de questões levantadas durante a utilização do ensaio para a avaliação da toxicidade de efluentes industriais. Sendo assim, os resultados apresentados nos itens seguintes fazem parte de um estudo comparativo entre alguns métodos padronizados do ensaio de toxicidade com a alga *S. subspicatus* e têm como objetivos específicos:

1. estudar alguns parâmetros para a realização do teste de toxicidade, tal como: a escolha do método para a determinação da concentração da alga;
2. investigar as melhores condições para a realização do ensaio, como as condições do inóculo, a composição de meios de cultura e, estudar as mudanças do pH durante a realização do ensaio.

III.1.1- Métodos para a determinação da concentração da alga

A medida da concentração efetiva da alga é determinante no cálculo da taxa de crescimento diário (item II.1.1) e, conseqüentemente, no resultado do ensaio de toxicidade. O maior problema localiza-se na determinação de baixas concentrações celulares, isto é, na medida feita no tempo zero, logo após o inóculo da alga. Por esse motivo, é importante a escolha de um método sensível a baixas concentrações da alga.

A escolha do método para a determinação da concentração da alga depende do objetivo do estudo a ser realizado mas, normalmente, fatores como a sensibilidade e limitações do método, praticidade, disponibilidade do equipamento e

possíveis interferências causadas pelas características da amostra devem ser levadas em consideração.

Nesse trabalho foram correlacionados diferentes métodos para medir a concentração da alga, sejam eles: gravimetria (massa seca), espectrofluorimetria (fluorescência), espectrofotometria (absorvância) e microscopia (contagem de células). Uma vez que os métodos apresentam diferentes sensibilidades, foram obtidas as correlações entre eles para elevadas e baixas concentrações da alga cultivadas em controles conforme as condições descritas no item II.1.1a) (figuras de 5 a 11).

Com relação à diferença de sensibilidade entre os métodos, Peterson e Nyholm (1993) alertaram para a dificuldade em se determinar biomassa em baixas concentrações celulares, principalmente, pela simples medida da absorvância, recomendando para esse fim, métodos sensíveis como a espectrometria de fluorescência molecular.

Como pode ser observado na figura 5, a medida da absorvância e da fluorescência apresentaram alta correlação para a determinação da concentração alga, porém, um decréscimo da correlação foi observado para baixas concentrações celulares (figura 6). A espectrofluorimetria é um método sensível, chegando a detectar concentrações entre $0,1 \text{ picomol.L}^{-1}$ e $1,0 \text{ nanomol.L}^{-1}$ dependendo do aparelho utilizado e do tamanho do "background signal", ou seja, da fluorescência do meio onde se encontra a espécie a ser determinada. Porém, a presença de moléculas orgânicas como proteínas e aminoácidos aromáticos (triptofano), os quais apresentam fluorescência, podem interferir se presentes na composição do efluente a ser analisado (Ingle e Crouch, 1988). Além disso, partículas ou turvações presentes nas amostras podem atenuar a radiação de excitação ou de emissão causando alterações na fluorescência da molécula (Kotzick e Niesser, 1996).

Com base nesses conhecimentos, pode-se afirmar que as possíveis interferências na medida da fluorescência estão relacionadas, principalmente, com alterações da radiação de excitação ou de emissão por parte do meio onde a alga se encontra.

Considerando que o ensaio com algas é utilizado, normalmente, para a avaliação da toxicidade de efluentes, os quais apresentam uma composição

indefinida, pode-se esperar que a presença de partículas, coloração e, até mesmo, o crescimento de bactérias no meio durante a realização do ensaio venham interferir na determinação da concentração da alga por métodos óticos como a espectrofluorimetria e a espectrofotometria.

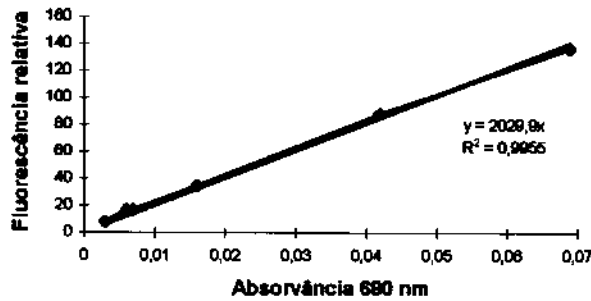


Figura 5: correlação entre a medida da concentração da alga por absorvância em 680 nm e pela fluorescência (λ_{ex} 435 nm e λ_{em} 685 nm).

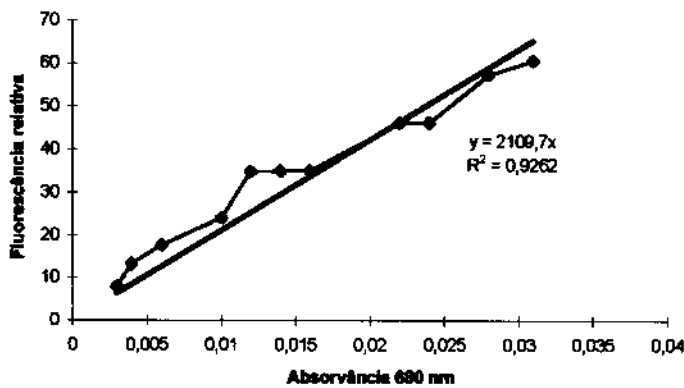


Figura 6: correlação entre a medida da concentração da alga por absorvância em 680 nm e pela fluorescência (λ_{ex} 435 nm e λ_{em} 685 nm) para baixas concentrações de alga.

A fluorescência *in vivo* de uma suspensão de algas está relacionada com a sua concentração de clorofila *a*, sendo esta dependente do estado fisiológico em que a alga se encontra, o qual está relacionado, entre outros fatores, ao regime prévio de luz a que a alga estava submetida. Para contornar as possíveis interferências às quais a determinação da clorofila *in vivo* está sujeita, é possível realizar a extração da clorofila *a* com solventes orgânicos. A extração da clorofila apresenta a vantagem de desvincular a medida da fluorescência da clorofila *a* *in vivo* dos processos bioquímicos aos quais ela está envolvida (Mayer e col., 1997). O

maior argumento contra a extração da clorofila *a*, ou seja, a determinação da clorofila *in vitro*, é que o método envolve alguns passos de filtração e a necessidade de um período relativamente longo de extração (24 h) - dois fatores de consumo de tempo e que se constituem em fontes de erros. Como pode ser observado nas figuras 7, 8 e 9, a extração da clorofila *a* apresentou alta correlação com a absorvância para altas concentrações da alga, sendo o coeficiente de correlação encontrado entre as medidas de $r^2=0,9876$ (figura 7). No entanto, quando baixas concentrações da alga foram avaliadas, a correlação obtida entre a extração de clorofila e a absorvância em 680 nm (figura 8) diminuiu ($r^2=0,9418$), ao passo que com a fluorescência foi de $r^2=0,9877$ (figura 9).

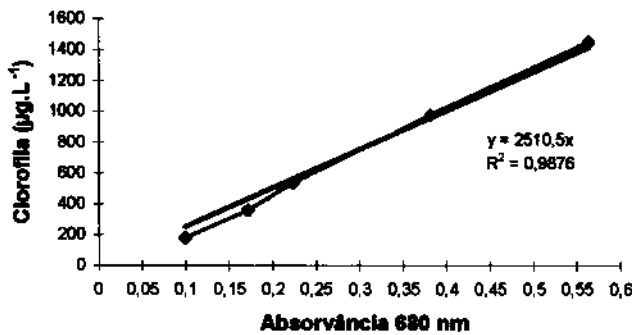


Figura 7: correlação entre a medida da concentração da alga por absorvância em 680 nm e por extração de clorofila *a*.

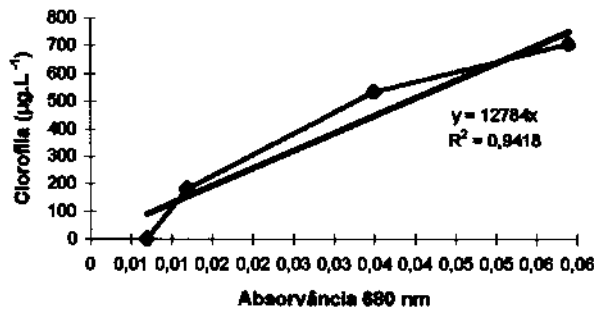


Figura 8: correlação entre a medida da concentração da alga por absorvância em 680 nm e por extração de clorofila para baixas concentrações de alga.

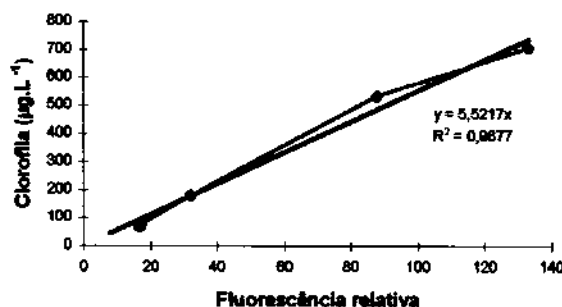


Figura 9: correlação entre a medida da concentração da alga por fluorescência (λ_{ex} 435 nm e λ_{em} 685 nm) e por extração de clorofila para baixas concentrações de alga.

Além da sensibilidade do método, deve-se considerar que o ensaio com algas é muitas vezes utilizado em programas de monitoração de águas superficiais, onde um número elevado de amostras é avaliado periodicamente (Bertoletti e col., 1989). Nesse caso, convém ser prática e rápida a determinação da concentração celular. Como pode ser observado na figura 10, a contagem de células apresentou alta correlação quando comparada com a fluorescência, demonstrando ser sensível para a determinação de baixas concentrações de alga. Todavia, na prática, a sua utilização para um grande número de amostras é dificultada pelo trabalho envolvido nessa atividade.

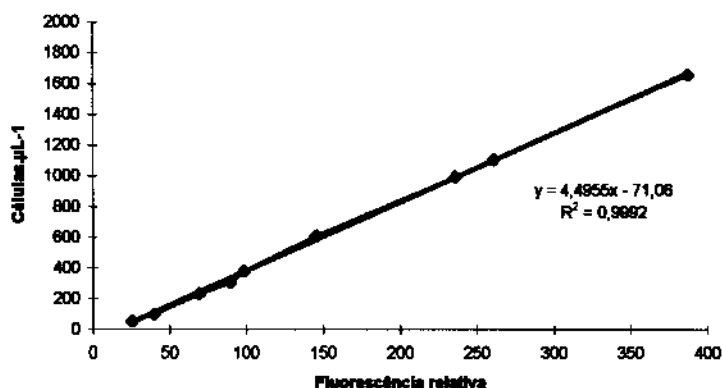


Figura 10: correlação entre a medida da concentração da alga por fluorescência (λ_{ex} 435 nm e λ_{em} 685 nm) e por contagem de células.

Outra possibilidade de medida da concentração celular recomendada pelas normas oficiais, é a determinação da massa celular seca. Entretanto, esta requer uma concentração elevada de células, afim de que a concentração da alga seja suficiente para evitar possíveis erros na determinação de pequenas concentrações de alga. Como pode ser verificado na figura 11, a correlação com a absorvância foi relativamente baixa, em função, principalmente, das baixas concentrações de alga.

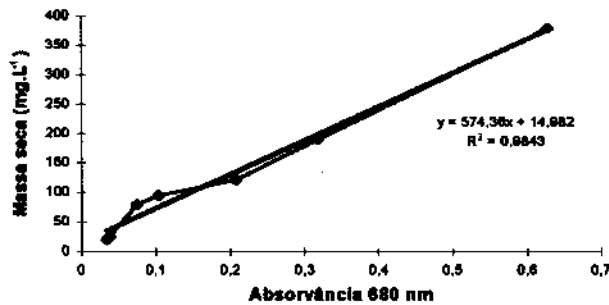


Figura 11: correlação entre a medida da concentração da alga por absorvância em 680 nm e por massa seca.

Além dos aspectos abordados relacionados com a sensibilidade e limitações dos métodos, a medida de diferentes parâmetros na realização do ensaio de toxicidade pode refletir efeitos específicos no metabolismo da alga, como por exemplo, a medida da taxa de fotossíntese pela determinação da fixação de carbono a qual reflete um efeito fisiológico específico, enquanto a medida do crescimento reflete um efeito integrado de todos os processos fisiológicos (Peterson e Nyholm, 1993). Nesse sentido, Caux e col. (1996) verificaram os efeitos fisiológicos causados à alga *S. capricornutum* por diferentes herbicidas, utilizando contagem de células viáveis, inibição do crescimento da alga e inibição da fotossíntese como parâmetros para indicar diferentes efeitos de toxicidade. O primeiro parâmetro (contagem de células viáveis) foi usado pelos autores para indicar o efeito letal do herbicida (algicida), enquanto os dois últimos (crescimento e fotossíntese) foram usados para detectar o efeito subletal (algistático) dos agentes testados.

Com base nas correlações observadas nesses experimentos, pode-se afirmar que a contagem de células e a fluorescência foram mais sensíveis para determinar concentrações celulares, embora estas tenham sido testadas apenas em controles. Porém, nesse trabalho utilizou-se, na maioria dos experimentos, a medida da absorvância da clorofila *a* em 680 nm pelo simples motivo da disponibilidade do aparelho.

III.1.2- Estudo do inóculo da alga

O bom estado fisiológico da cultura da alga, que será usada no ensaio de toxicidade como organismo indicador, é fundamental na obtenção das respostas de toxicidade. Os métodos oficiais do ensaio recomendam a utilização de uma cultura axênica da alga, isto é, uma cultura pura e monoespecífica, livre de outros microorganismos e que o inóculo seja realizado na fase exponencial do crescimento da alga (ISO, 1989; DIN 38412; APHA, 1992).

O método ISO 8692 define o período de 3 dias de crescimento da alga como o mais adequado para o inóculo: as normas DIN 38412 consideram apropriado o período de crescimento da alga entre o 2º e o 3º dia. A norma recomendada pela U.S. EPA aceita que o inóculo seja realizado com culturas de até uma semana de crescimento. Porém, o período de crescimento do inóculo varia em função da composição do meio de cultura.

Como pode ser observado na figura 12, a fase exponencial do crescimento da alga *S. subspicatus*, sob as condições descritas no item II.1.1, compreende o período entre o 1º e o 3º 24 e 72 horas, aproximadamente.

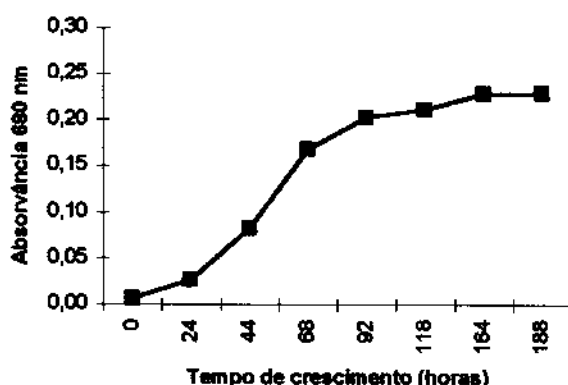


Figura 12: curva de crescimento da alga *S. subspicatus*.

Na tabela 8 encontram-se as médias das taxas de crescimento da alga (μ) e respectivos desvios padrões das culturas inoculadas com alga em diferentes tempos de crescimento.

Tabela 8: médias das taxas de crescimento da alga inoculada com culturas de idades diferentes.

Idade do inóculo (dias)	Taxa de crescimento (μ)	Média
2	(1,074;1,082;1,076)	$1,077 \pm 0,023$
3	(1,063;1,057;1,053)	$1,057 \pm 0,023$
4	(1,044;1,051;1,049)	$1,049 \pm 0,020$
5	(0,999;1,010;1,016)	$1,008 \pm 0,047$
6	(0,987;1,003;1,002)	$0,997 \pm 0,049$

Conforme apresentado na tabela 8 e ilustrado na figura 13, as taxas de crescimento da cultura de alga diminuem com a idade do inóculo. A cultura inoculada com a alga entre o seu 2º e o 4º dias de crescimento praticamente não apresentaram diferenças entre as taxas de crescimento. A diferença entre as taxas das culturas inoculadas com algas de 5 e 2 dias de crescimento foi em torno de 10%. Esse decréscimo da taxa de crescimento significa, provavelmente, a exaustão dos nutrientes disponíveis no meio, o qual determina as condições fisiológicas da alga. Portanto, nas condições nas quais o experimento foi realizado,

o melhor período observado para o inóculo da alga foi entre o 2º e o 4º dias de crescimento.

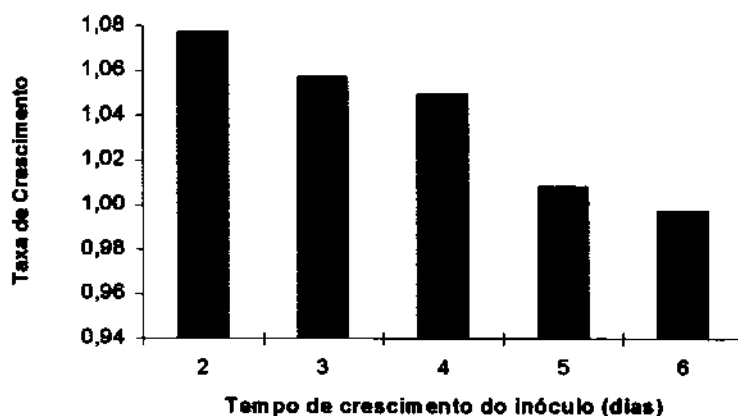


Figura 13: taxa de crescimento da alga *S. subspicatus* em função do inóculo

Com relação à concentração inicial de células de alga para o início do ensaio, a maioria dos ensaios padronizados sugerem 10^4 células.mL⁻¹. O método da agência ambiental americana recomenda o uso de 10^3 células.mL⁻¹ e o método da ABNT 10^4 a 10^5 células.mL⁻¹ (APHA, 1992; ABNT, 1992).

A utilização de concentrações mais baixas de alga apresenta vantagens, uma vez que concentrações elevadas provocam mudanças físico-químicas do meio de cultura durante a realização do teste, como por exemplo, o aumento do pH pelo consumo excessivo de HCO_3^- do meio. Mayer e col. (1997) alertaram para o fato de que a concentração final de alga, normalmente encontrada nos testes de toxicidade, excede as concentrações da maioria dos ambientes naturais. Por esse motivo, é recomendável a utilização de baixas concentrações celulares e, para isso, é reforçada a idéia da necessidade de métodos sensíveis para a determinação de baixas concentrações de alga, conforme discutido no item III.1.1.

Com o objetivo de determinar a concentração mais adequada de alga (dentro da faixa de 10^4 células.mL⁻¹), foram estudadas as concentrações apresentadas na tabela 9 e calculadas as taxas de crescimento da alga após 72 horas.

Tabela 9: médias das taxas de crescimento da alga em relação à concentração inicial de células.

Concentração inicial de células (10^4 células.mL ⁻¹)	Taxa de crescimento (μ)	Média
5,8	(1,248; 1,216; 1,256)	$1,240 \pm 0,117$
6,3	(1,231; 1,233; 1,230)	$1,231 \pm 0,008$
6,9	(1,242; 1,238; 1,232)	$1,237 \pm 0,028$
7,2	(1,245; 1,243; 1,255)	$1,248 \pm 0,035$
7,7	(1,202; 1,200; 1,204)	$1,202 \pm 0,011$

Nesse estudo, percebeu-se a tendência de a taxa de crescimento da alga diminuir com o aumento da concentração do inóculo. A diferença encontrada entre a menor ($5,8 \times 10^4$ células.mL⁻¹) e a maior ($7,7 \times 10^4$ células.mL⁻¹) concentração de inóculo não foi significativa. Desse modo, pode-se admitir que, nas condições utilizadas nesse experimento, todas as concentrações de inóculo testadas foram apropriadas para a realização do ensaio com a alga *S. subspicatus*.

III.1.3- Mudanças do pH no ensaio com algas

Ao contrário do que acontece em ambientes naturais, sob condições de laboratório, a disponibilidade de fontes de carbono é mais limitada. Relaciona-se tal ocorrência à alta concentração de alga utilizada no ensaio e à falta de CO₂ proveniente da degradação microbiológica de compostos orgânicos, normalmente presentes em ambientes naturais (Nyholm e Källqvist, 1989). Conforme descrito no item I.2, um aumento do pH do meio pode ser observado quando a suplementação de CO₂ proveniente da atmosfera for insuficiente e a alga recorrer ao NaHCO₃ ou Na₂CO₃ disponíveis no meio como fonte de CO₂.

Uma questão importante quanto ao pH no ensaio de toxicidade, nem sempre mencionada nos protocolos oficiais, é o ajuste do pH inicial da amostra para a realização do ensaio. O método ISO 8692 recomenda que o teste seja realizado sem o ajuste do pH da amostra, porém ressalva que, para evitar que a toxicidade da substância analisada seja influenciada por pH extremos, pode-se ajustar o da solução de sais (composição no anexo I) para $7,0 \pm 0,2$. Assim, a amostra atingiria o

mesmo pH para o início do ensaio. A norma técnica da ABNT (NBR-12648) descreve o mesmo procedimento. A norma "DIN 38412 Teil 33" recomenda o ajuste do pH para $7,0 \pm 0,2$, enquanto que a "DIN 38412 Teil 9" permite que o teste seja realizado com o pH original da amostra.

Na figura 14 encontra-se representado o crescimento da alga *S. subspicatus* em controles (água destilada) contendo 10 % de meio ISO (anexo I) em diferentes pH. Para obter o pH desejado durante a realização do experimento, foi adicionado tampão HEPES ($7,5 \text{ mmol.L}^{-1}$) ao meio, após comprovar que a concentração utilizada não causava inibição do crescimento da alga (figura 19).

Estudou-se a faixa de pH entre 5 e 12 e, como se observa na figura 14 e na tabela 10, em pH 5,0, a alga *S. subspicatus* apresentou praticamente 100 % de inibição do crescimento. Porém, aumentando-se o pH para 6,0, a taxa de crescimento foi apenas 20 % inferior quando comparada ao controle (pH inicial $\cong 8,0$, sem a adição de tampão HEPES). A faixa de pH entre 7,0 e 10,0 parece ser a mais apropriada para o crescimento da alga. A partir de pH 10,0 o crescimento da alga foi novamente inibido.

Extrapolando-se os resultados obtidos com a alga *S. subspicatus*, pode-se admitir que a liberação de efluentes em corpos d'água com pH abaixo de 6 ou acima de 10 poderá inibir a produção primária.

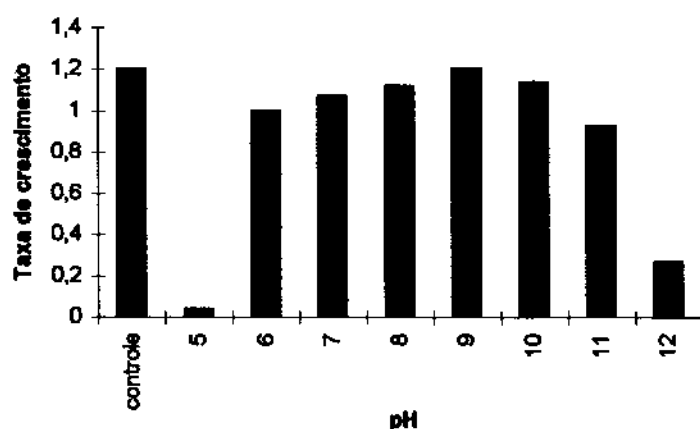


Figura 14: taxas de crescimento da alga *S. subspicatus* em função do pH, após 72 horas de crescimento (vide condições item II.1.1).

Tabela 10: médias das taxas de crescimento da alga em diferentes pH.

pH	Taxa de crescimento (μ)	média
controle	1,191; 1,197; 1,207	$1,20 \pm 0,008$
5	0,040; 0,002; 0,032	$0,04 \pm 0,036$
6	1,001; 1,049; 0,972	$1,01 \pm 0,074$
7	1,052; 1,070; 1,068	$1,07 \pm 0,137$
8	1,125; 1,129; 1,151	$1,13 \pm 0,066$
9	1,204; 1,212; 1,200	$1,20 \pm 0,024$
10	1,136; 1,145; 1,127	$1,14 \pm 0,016$
11	0,928; 0,897; 0,921	$0,92 \pm 0,057$
12	0,263; 0,257; 0,268	$0,26 \pm 0,010$

Com relação ao pH, ressalte-se ainda que a sua manutenção no decorrer do ensaio de toxicidade é importante, uma vez que a toxicidade de alguns compostos está estreitamente relacionada com o pH do meio no qual o mesmo se encontra. Os métodos padronizados mencionam que o pH do meio de cultura da alga não deve exceder mais do que 1,5 (ISO, 1989; DIN 38402, 1991) ou 1,0 (OECD, 1984) unidade do pH inicial. O método U.S.EPA também é bastante restritivo em relação ao pH, não permitindo que ele ultrapasse de 8,5 (sendo que o pH inicial do meio de cultura é em torno de 8,0) (APHA, 1992). A norma brasileira proposta pela ABNT não menciona limites de pH durante a realização do ensaio (ABNT, 1992). Peterson e Nyholm (1993) afirmam serem inaceitáveis variações de 1,0 a 2,0 unidades de pH, conforme prevêem os protocolos oficiais, na determinação da toxicidade de metais.

A mudança de pH, observada durante o crescimento da alga, está estreitamente relacionada com a composição do meio de cultura adotado (figuras 15 e 16). Uma das estratégias usadas para a manutenção do pH do meio de cultura é controlar o crescimento da alga para diminuir a utilização de HCO_3^- e, conseqüentemente, o aumento do pH. Nesse sentido, alguns autores defendem a utilização de concentrações mais baixas de inóculo e de nutrientes no meio de cultura para limitar o crescimento da alga (Comber e col., 1995; Chen e Lin, 1997).

Apesar de a maioria das normas internacionais de ensaio com algas (EN, 1993; DIN 38402, OECD, 1984) adotarem o meio de cultura descrito pela norma ISO 8692, ainda são usados meios de cultura de composições diferentes. Exemplo

disso, é o meio recomendado pela U.S. EPA o qual apresenta algumas diferenças quando comparado com o meio ISO 8692 (ver anexo I).

Uma das diferenças apresentadas entre os dois meios encontra-se na concentração de nitrogênio e fósforo (relação N/P). Enquanto o meio ISO 8692 apresenta $N/P = 11$, no meio U.S. EPA esta relação é 23 e, embora tal meio não tenha sido usado neste trabalho, a sua composição apresenta-se no anexo I apenas a título de comparação.

Diferentes relações N/P (11,3; 22,5 e 45,0) foram estudadas por Chen e Lin (1997) na determinação da toxicidade do Cd pelo ensaio com algas. Os autores constataram não ter havido diferença significativa nos resultados de toxicidade para as taxas de N/P mais elevadas (22,5 e 45,0) porém, observou-se que a taxa de 11,3 apresentou menor sensibilidade na determinação da toxicidade do Cd. No mesmo estudo, os pesquisadores verificaram que a alga foi mais sensível à determinação da toxicidade do Cd em condições de limitação de fosfato. Levando-se em consideração esse exemplo, o meio U.S.EPA seria mais apropriado para a determinação da toxicidade de metais por apresentar uma relação N/P maior que o meio ISO devido, principalmente, à baixa concentração de fosfato.

Na Alemanha, a composição do meio de cultura utilizado pelas normas DIN é idêntico ao da ISO 8692 porém, informalmente, é utilizado pela própria agência de proteção ambiental alemã um meio de cultura proposto por Bringmann e Kühn (1980) modificado, o qual foi denominado nesse trabalho de SCE (composição no anexo I).

O crescimento da alga *S. subspicatus* nos meios de cultura SCE e ISO e as mudanças de pH nos referidos meios foram comparadas e estão representadas nas figuras 15 e 16, respectivamente.

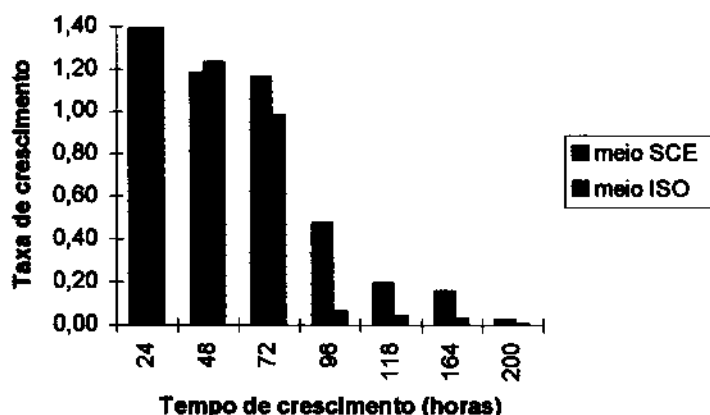


Figura 15: Crescimento da alga *S. subspicatus* nos meios SCE e ISO (vide condições ítem II.1.1).

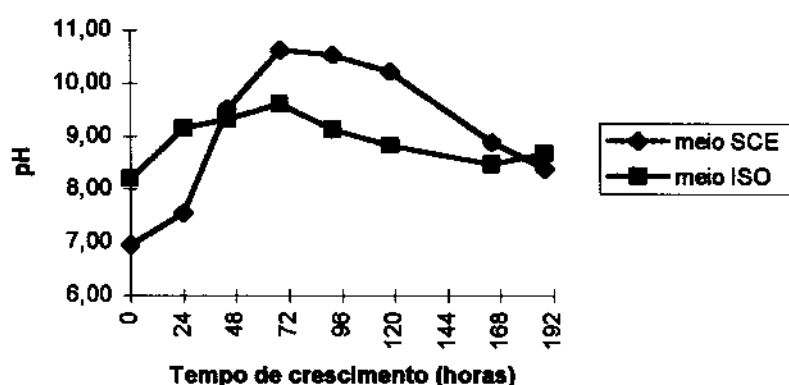


Figura 16: pH dos meios SCE e ISO durante o crescimento da alga *S. subspicatus* (vide condições ítem II.1.1).

Conforme pode ser observado na figura 15, o crescimento da alga nas primeiras 48 horas assemelhou-se nos dois meios de cultura estudados. A partir do 3º dia de crescimento, ou seja, de 72 horas, o crescimento da alga no meio ISO foi menor quando comparado ao meio SCE. A observação relatada está relacionada com o aumento do pH do meio (figura 16), o qual, no período de 72 horas, aumentou aproximadamente 1,5 unidades no meio ISO e 3,5 unidades no meio SCE. A observação da composição dos meios de cultura descritos no anexo I auxilia o entendimento de tal fenômeno. Os dois meios apresentam na sua composição basicamente os mesmos sais. Contudo, as suas concentrações são mais elevadas

no meio SCE, fato explicativo do maior crescimento da alga nesse meio, e, conseqüentemente, do aumento do pH do meio.

Além da elevada concentração de nutrientes, outro fator que pode levar ao aumento do pH é a forma de nitrogênio usada nos meios de cultura. A maioria das algas consomem, preferencialmente, amônio como fonte de nitrogênio, entretanto, nitrato é a principal fonte de nitrogênio encontrada em águas superficiais (Kohl e Nicklisch, 1988). O consumo de nitrato e amônio pela alga promove aumento e diminuição do pH do meio respectivamente. Isto se deve ao fato que a assimilação do amônio ocorre diretamente, enquanto que o nitrato precisa ser reduzido a amônio antes de poder ser assimilado pelas algas (Peterson e Nyholm, 1993). Dessa forma, o uso de nitrato no meio de cultura representa com mais fidelidade o ambiente natural, ao passo que, em termos de controle de pH do meio, o uso de amônio é mais eficaz.

Existem trabalhos na literatura nos quais foi adotada a adição de tampões aos meios de cultura em ensaios de toxicidade, principalmente, quando é conhecido ou suspeita-se que a toxicidade da substância avaliada depende do pH do meio onde ela se encontra. Nesse sentido, Madsen (1984) adicionou tampão Trisma-maleato (10 mmol.L^{-1}) ao meio de cultura ISO para investigar a toxicidade do 4-nitrofenol, alegando a impossibilidade de manutenção do pH na faixa desejada apenas pela dissolução de CO_2 no meio promovida pela agitação dos frascos-teste. Esse estudo revelou que a manutenção do pH do meio diminuiu o efeito tóxico do composto às algas.

Tendo em vista a importância da manutenção do pH na determinação da toxicidade, foram adicionadas diferentes substâncias tampão ao meio de cultura SCE. Nesses experimentos, verificaram-se as mudanças do pH do meio durante o crescimento da alga *S. subspicatus*, conforme representado nas figuras de 17 a 20, considerando-se que o pH inicial do meio SCE é aproximadamente 7,0.

Nesse tipo de estudo é importante que a substância tampão utilizada não iniba o crescimento da alga. Assim, foi verificado o crescimento da alga em diferentes concentrações dos tampões em relação a um controle (sem substância tampão), observando-se o pH do meio.

Na figura 17, está representada a taxa de crescimento da alga e o aumento do pH do meio em 10 % de meio SCE após 72 horas com a adição de diferentes concentrações de tampão TRIS. Nessa figura pode-se constatar que o tampão TRIS nas concentrações de 0,41 e 0,83 mmol.L⁻¹ manteve o aumento do pH inferior a 1,5 unidades, sendo que a taxa de crescimento da alga nestas concentrações não sofreu alterações significativas. A concentração mais elevada de tampão TRIS testada neste experimento, 4,2 mmol.L⁻¹, causou uma leve diminuição da taxa de crescimento da alga (de 1,2 para 1,16).

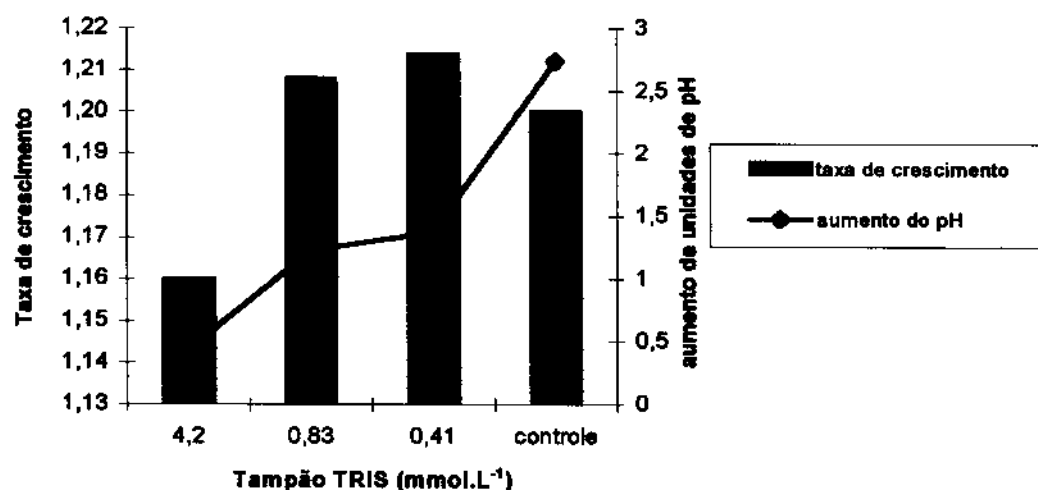


Figura 17: taxa de crescimento da alga *S.subspicatus* e aumento do pH do meio SCE após 72 horas com a adição de diferentes concentrações de tampão TRIS

A adição de tampão citrato ao meio de cultura SCE na faixa entre 0,095 e 1,89 mmol.L⁻¹, conforme demonstrado na figura 18, não alterou a taxa de crescimento da alga porém, o pH do meio após 72 horas aumentou aproximadamente 3,0 unidades. A concentração mais elevada de tampão citrato adicionada ao meio (9,54 mmol.L⁻¹) diminuiu em 50 % a taxa de crescimento da alga. Nesse caso, deve-se observar que o pH inicial do meio, normalmente 7,0, nesse experimento foi 6,5, aumentando ainda mais a diferença do pH inicial e final (após 72 horas).

Errecalde e col. (1998) adicionaram tampão citrato ao meio de cultura da alga *S. capricornutum* para a determinação da toxicidade do cádmio e zinco e observaram que a biodisponibilidade do cádmio pela alga aumentou duas vezes em relação aos meios sem citrato. Nesse caso, o citrato parece ter aumentado a biodisponibilidade do cádmio à alga. Essa característica relatada pelos pesquisadores, associada ao decréscimo da taxa de crescimento da alga observada na figura 18, inviabiliza o uso de tampão citrato no ensaio de toxicidade com alga.

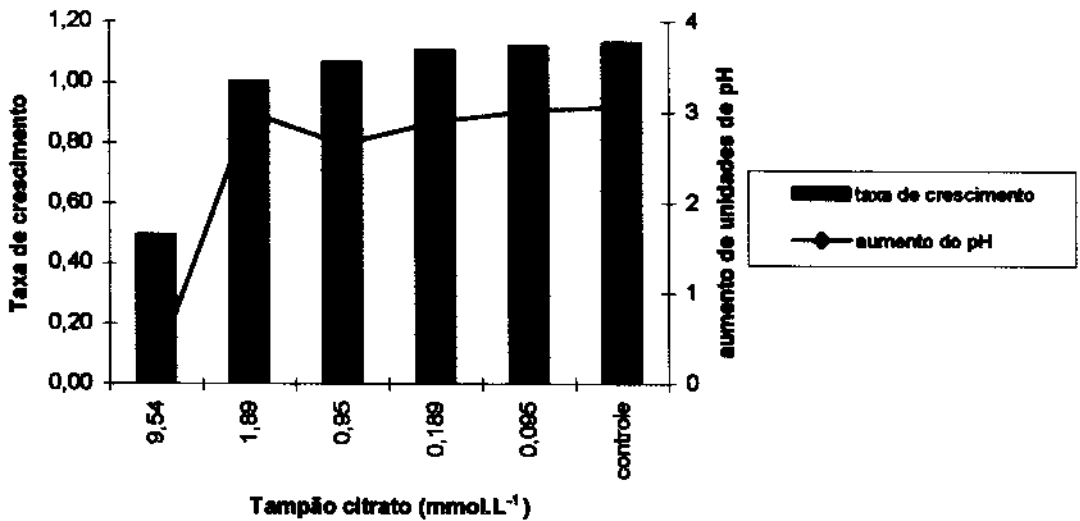


Figura 18: taxa de crescimento da alga *S. subspicatus* e aumento do pH do meio SCE após 72 horas com a adição de diferentes concentrações de tampão citrato.

Na figura 19 encontram-se representados o crescimento da alga *S. subspicatus* e o aumento do pH do meio SCE com adição do tampão HEPES. Na faixa entre 7,5 e 17,5 mmol.L⁻¹ de tampão HEPES, o pH do meio de cultura não aumentou mais do que 1,5 unidades e a taxa de crescimento da alga também permaneceu relativamente constante (entre 1,14 e 1,16).

Em estudos recentes, Keating e col. (1996) apontaram para a importância da manutenção do pH em ensaios de toxicidade e sugeriram o uso de tampão HEPES para realização do ensaio de toxicidade com daphnias. O uso do mesmo tampão foi sugerido para a cultura da alga verde *Ankistrodesmus convolutus* utilizada como

alimento no ensaio com daphnias. A concentração do tampão recomendada foi de 400 ppm ($3,36 \text{ mmol.L}^{-1}$) na qual não foi observada alteração fisiológica da alga. Os autores verificaram que a adição do tampão ao ensaio não alterou a toxicidade do Zn.

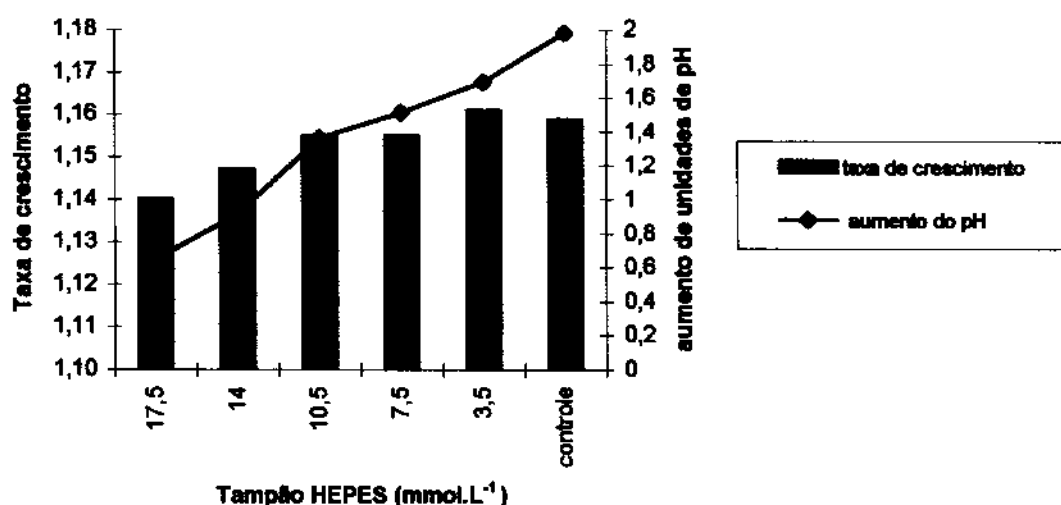


Figura 19: taxa de crescimento da alga *S.subspicatus* e aumento do pH do meio SCE após 72 horas com a adição de diferentes concentrações de tampão HEPES

Com base nos resultados obtidos pela adição de tampões ao meio de cultura SCE, pode-se afirmar que: a adição de citrato ao meio de cultura é limitada pela alteração da taxa de crescimento da alga. Nesse caso, dentre os tampões estudados o tampão TRIS utilizado nas concentrações entre $0,43$ e $0,83 \text{ mmol.L}^{-1}$ e o tampão HEPES, entre $7,5$ e $17,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ foram os mais apropriados para a manutenção do pH do meio SCE sem alterar o crescimento da alga. Cabe ressaltar não ter sido verificado nesse estudo o efeito destes tampões sobre a toxicidade de compostos.

Nesse trabalho, optou-se pelo uso do meio ISO sem a adição de tampão, pois considerou-se a manutenção do pH do meio (entre $8,0$ e $9,5$) suficiente para a avaliação de efluentes. Entretanto, a adição de tampões ao meio de cultura é útil quando forem desejadas pequenas variações do pH do meio. Nesse caso, recomenda-se o uso do tampão TRIS ou HEPES nas concentrações acima mencionadas.

III.1.4- Conclusões parciais

Conforme revelado na discussão dos itens anteriores, os ensaios de toxicidade, mesmo padronizados, diferem em alguns pontos.

Analisando-se as determinações da concentração de alga, verificou-se que: a contagem de células, a determinação da massa seca, a fluorescência, a absorvância e a extração de clorofila apresentam correlações altas quando são determinadas elevadas concentrações de alga (no final do ensaio). Porém, em baixas concentrações celulares (presentes no início do ensaio), as correlações diminuíram. As determinações da concentração da alga por contagem de células, fluorescência e extração de clorofila foram as mais adequadas para medir baixas concentrações celulares.

Nas condições nas quais esse estudo foi realizado, o inóculo da alga pode ser feito com culturas de 3 a 4 dias e a concentração entre $5,8$ e $7,7 \times 10^4$ células.mL⁻¹.

O ajuste ou não do pH inicial da amostra para o ensaio de toxicidade com alga influencia diretamente no crescimento da alga *S. subspicatus*, sendo que, em pH menores de 6,0 e acima de 10,0 constatou-se uma inibição significativa do crescimento da alga.

Dentre os tampões estudados, os mais indicados para a manutenção do meio de cultura SCE, sem alterar o crescimento da alga, foram o tampão TRIS e HEPES nas faixas de concentração entre 0,43 e 0,83 mmol.L⁻¹ e 7,5 e 17,5 mmol.L⁻¹ respectivamente. No entanto, a interação de potenciais agentes tóxicos com essas substâncias tampão precisa ser estudada antes de eles serem adicionados ao meio de cultura.

III.2- ESTUDO DA TOXICIDADE DE EFLUENTES DE UMA INDÚSTRIA PRODUTORA DE PECTINA POR MÉTODOS FÍSICO-QUÍMICOS E ENSAIOS DE TOXICIDADE

Nessa parte do trabalho, utilizou-se uma combinação de métodos físico-químicos e testes de toxicidade a fim de se estudar o potencial tóxico de efluentes gerados por uma indústria produtora de pectina. O objetivo desse estudo foi investigar a eventual toxicidade apresentada pelo efluente final da indústria (após o sistema de tratamento de efluentes - STE) e identificar a sua causa. Considerando ter apresentado o efluente final uma coloração marrom escura especialmente indesejável (considere que o efluente seria lançado em corpos d'água próximos à região turística na Alemanha), desejou-se investigar também a origem da referida coloração. Tendo em vista tais objetivos, foram caracterizados o efluente gerado na produção da pectina e nas diferentes etapas do seu STE.

III.2.1- Caracterização físico-química dos efluentes

Na tabela 11 podem ser observados os resultados das análises referentes à caracterização físico-química do efluente da produção (amostra 1) e os efluentes de diferentes etapas do STE (amostras 2 a 4).

Os parâmetros ligados à concentração de material orgânico como DQO, DBO₅ e COD, diminuíram com as etapas de tratamento em relação ao efluente da produção. A DBO₅, parâmetro indicador da concentração do material biologicamente degradável dos efluentes, foi praticamente eliminada no STE, ou seja, no efluente final, esse valor chegou a 4,6 mg.L⁻¹. Contudo, a cor do efluente aumentou, principalmente, nas amostras 2 e 3, ou seja, nos efluentes coletados após a etapa de desnitrificação e tratamento anaeróbio, nos quais verificou-se um aumento de cor de aproximadamente 30 % em relação a amostra 1 (ver anexo II).

A concentração de cloretos totais das amostras permaneceu praticamente inalterada antes e após as etapas de tratamento de efluentes.

A relação DBO_5/DQO é um parâmetro utilizado para indicar a biodegradabilidade de efluentes (Göbbels e Püttmann, 1997). O valor de DBO_5/DQO menor que 0,1 indica que mais de 90 % do carbono orgânico dissolvido não pode ser degradado biologicamente (Kettern, 1990). Dentre as amostras estudadas, a amostra 4 apresentou a menor relação DBO_5/DQO (tabela 11). De acordo com esse critério, pode-se afirmar que a amostra 4 apresenta mais dificuldade de ser degradada por métodos biológicos que as demais amostras.

Tabela 11: caracterização físico-química dos efluentes da indústria de pectina

Parâmetros físico-químicos	Amostras ^{a)}			
	1	2	3	4
pH	2,1	7,7	8,2	8,9
condutividade (mS.cm^{-1})	42,8	14,1	15,4	13,0
DQO (mg.L^{-1})	19855	7539	1100	421
DBO_5 (mg.L^{-1})	13348	6288	345	4,6
DBO_5/DQO	0,67	0,83	0,31	0,1
COD (mg.L^{-1})	8357	2082	202	151
cor $\text{Abs}_{430\text{nm}}$	0,756	1,086	1,189	1,115
cloretos totais (mg.L^{-1})	147	nd	nd	145
$\text{NH}_4\text{-N}$ (mg.L^{-1})	37,7	70,8	nd	0,48
$\text{NO}_3\text{-N}$ (mg.L^{-1})	2780,0	24,4	nd	258
$\text{NO}_2\text{-N}$ (mg.L^{-1})	4,7	< 0,015	nd	< 0,015
$\text{o-PO}_4\text{-P}$ (mg.L^{-1})	16,88	nd	nd	15,6

^{a)} 1) efluente da produção; 2) efluente após etapa de desnitrificação; 3) efluente após tratamento anaeróbio; 4) efluente final
nd = não determinado

III.2.2- Caracterização toxicológica dos efluentes

Para avaliar as amostras estudadas quanto ao seu potencial tóxico, empregaram-se 3 testes de toxicidade: teste respirométrico utilizando lodo ativado como indicador; Lumistox®, usando bactérias luminescentes; e o ensaio com a alga verde *S. subspicatus*.

a) método respirométrico com lodo

A diminuição da atividade respiratória de um lodo pela adição de diferentes volumes das amostras estudadas reflete uma possível toxicidade dos efluentes sobre uma população mista de microorganismos (lodo). A atividade respiratória das amostras de 1 a 4 em contato com lodo proveniente de um sistema de tratamento de efluentes domésticos está representada na figura 20.

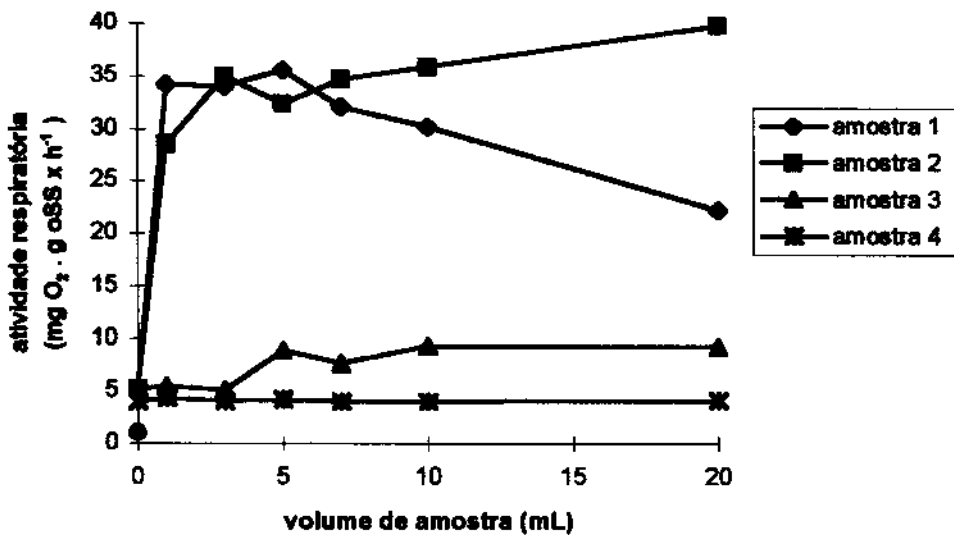


Figura 20: atividade respiratória de um lodo de STE doméstico em contato com diferentes volumes das amostras da indústria produtora de pectina.

A adição de pequenos volumes (2,0 4,0 e 5,0 mL) do efluente vindo da produção de pectina (amostra 1) promoveu uma estimulação (aumento) da atividade respiratória do lodo em relação ao controle (volume de amostra = 0 e respiração 4,8 mg O₂ x g SSo x h⁻¹). Porém, quando volumes acima de 7,0 mL do efluente foram adicionados ao sistema, observou-se uma queda da respiração quando comparada pela adição de 5,0 mL da amostra (35 mg O₂ x g SSo x h⁻¹). Esses resultados indicam que a amostra 1, nas concentrações testadas, foi degradada pelos microorganismos componentes do lodo. Entretanto, parece haver uma tendência a diminuição da respiração do lodo com o aumento da concentração da amostra indicando ser necessária a investigação do efeito de concentrações mais elevadas da amostra.

Observando-se o comportamento das amostras 2 e 3 em contato com o lodo, também foi constatado um aumento da respiração do mesmo em relação ao controle (volume de amostra = 0 e respiração 4,8 mg O₂ x g SSo x h⁻¹) para todos os volumes de efluentes adicionados. Isto significa que as amostras, nas concentrações utilizadas nesse estudo, não inibiram a respiração do lodo, pelo contrário, foram consumidas pelos microorganismos constituintes do mesmo.

A adição da amostra 4 (efluente final) ao sistema com lodo, nos volumes estudados, não alterou a respiração do consórcio de organismos indicadores.

A desvantagem do uso desse tipo de ensaio reside na dificuldade de reproduzi-lo, uma vez que, a cada determinação, a população de microorganismos usada como indicadora (lodo) difere, dificultando a padronização do método (Gunkel, 1994). Entretanto, Nirmalakhandan e col. (1994) encontraram um coeficiente de correlação de $r^2=0,922$ comparando a toxicidade de uma mistura de compostos orgânicos sobre um consórcio de organismos adquiridos comercialmente (Polytox®) e lodo ativado proveniente de uma planta de tratamento de esgotos domésticos.

Os estudos de toxicidade com lodo ativado são especialmente interessantes quando se deseja obter informações a respeito do efeito de um determinado efluente sobre a população de organismos (lodo) com a qual ele entrará em contato. Esse tipo de informação é essencial a fim de se saber, por

exemplo, se um efluente industrial poderá ser tratado em uma planta de tratamento de efluentes domésticos sem inibir a atividade do lodo (Gunkel, 1994). Com esse objetivo, Roubidoux e col. (1998) utilizaram o teste respirométrico com lodo para investigar descargas de efluentes industriais tóxicos num STE domésticos municipal.

b) teste de toxicidade com bactéria luminescente

Na tabela 12 encontram-se representados os valores de CE50 e CE20 dos efluentes (concentrações que inibiram 50 e 20% da luminescência da bactéria, respectivamente) obtidos pelo teste com a bactéria luminescente *V. fischeri*. As curvas concentração-resposta (% amostra x % inibição) de cada amostra, das quais foram interpolados ou extrapolados os valores de CE50 e CE20, encontram-se no anexo IV.

Tabela 12: estimativa das médias de CE50 e CE20 e respectivos intervalos de confiança (95 %) dos efluentes da indústria de pectina frente a bactéria *V. fischeri*.

Amostras	CE50 (% v/v)	CE20 (% v/v)
1	6,44 ^{a)} (2,13-10,75)	1,45 (0,44-2,47)
2	11,95 ^{a)} (8,90-15,00)	4,14 (3,12-5,16)
3	51,30 ^{b)} (46,98-55,61)	19,00 (17,98-20,02)
4	33,44 ^{c)} (30,39-36,49)	4,38 (3,36-5,39)

^{a)} médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade

Considerando os resultados de toxicidade das amostras tanto em termos de CE20 quanto de CE50 apresentados na tabela 12, pode-se afirmar que a amostra 1 apresentou a maior toxicidade à bactéria luminescente. Os valores de CE50 e CE20 mostraram que a toxicidade dos efluentes diminuiu até a amostra 3 e

voltou a aumentar na amostra 4. Este efeito pode ser mais bem observado na figura 21.

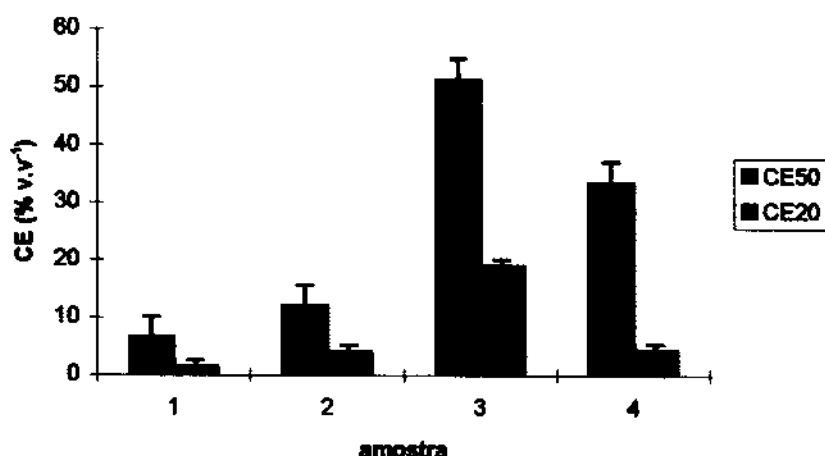


Figura 21: valores de CE50 e CE20 dos efluentes da indústria de pectina obtidos pelo teste com a bactéria *V. fischeri*.

Comparando-se os resultados obtidos pelo teste com lodo e com bactéria luminescente, pode-se afirmar que esta última apresentou maior sensibilidade aos efluentes estudados, pois concentrações menores de amostra inibiram o parâmetro subletal observado (nesse caso, a luminescência da bactéria). Kahru e col. (1996) também verificaram a maior sensibilidade da bactéria luminescente em relação ao lodo como indicador de toxicidade. Os pesquisadores investigaram a toxicidade de um efluente de indústria petrolífera com elevada concentração de compostos fenólicos usando o teste com bactéria luminescente (Microtox®) e 2 tipos de lodo, adaptado e não adaptado. Enquanto a CE50 encontrada para o sistema Microtox® foi de 0,6 % de efluente, este valor para o teste com lodo foi de 20-30 % para lodo o não adaptado e 50-60 % para o lodo adaptado.

c) teste de toxicidade com alga

A inibição da taxa de crescimento da alga *S. subspicatus* também foi usada como parâmetro para a avaliação ecotoxicológica das amostras estudadas.

As curvas concentração-resposta (% amostra X % inibição) apresentadas pelos efluentes estudados estão no anexo IV e os valores de C_{rE50} e C_{rE20} (concentrações que causaram 50 e 20 % de inibição da taxa de crescimento da alga respectivamente) obtidos por estas curvas estão apresentados na tabela 13.

Tabela 13: estimativas das médias de C_{rE50} e C_{rE20} e respectivos intervalos de confiança (95%) dos efluentes da indústria de pectina frente a alga *S. subspicatus*.

Amostras	C_{rE50} (% v.v ⁻¹)	C_{rE20} (% v.v ⁻¹)
1	5,67 (3,17-8,17)	3,49 (2,57-4,42)
2	17,77 (15,27-20,27)	5,09 (4,17-6,02)
3	70,16 (67,66-72,66)	8,94 (8,01-9,86)
4	49,31 (46,81-51,81)	30,05 (30,12-31,97)

todas as médias foram significativamente diferentes pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade

Observando os resultados obtidos pelo teste de toxicidade com algas apresentados na tabela 13, pode-se afirmar que a amostra mais tóxica foi a amostra 1, tanto pelo valor da C_{rE20} como da C_{rE50} .

Levando-se em consideração os valores de C_{rE20} observa-se que o efeito tóxico dos efluentes frente a alga diminuiu com as etapas do STE, pois as concentrações necessárias para inibir 20 % da taxa de crescimento da alga aumentaram. Porém, os valores de C_{rE50} revelaram que, conforme anteriormente observado para *V. fisheri*, a toxicidade dos efluentes diminuiu até a amostra 3, voltando a aumentar na amostra 4. Esses efeitos encontram-se representados na figura 22.

Como pode ser observado nas tabelas 12 e 13, a amostra proveniente da produção (amostra 1) apresentou a maior toxicidade frente aos dois organismos indicadores. Tal efeito tóxico deve-se, provavelmente, ao uso de isopropanol na produção de pectina, sendo ele o responsável por 70 % da DQO do efluente que entra no STE. A toxicidade do isopropanol a algas e bactérias luminescentes é

conhecida e foi estudada por Pedersen e Petersen (1996) em uma mistura de compostos tóxicos.

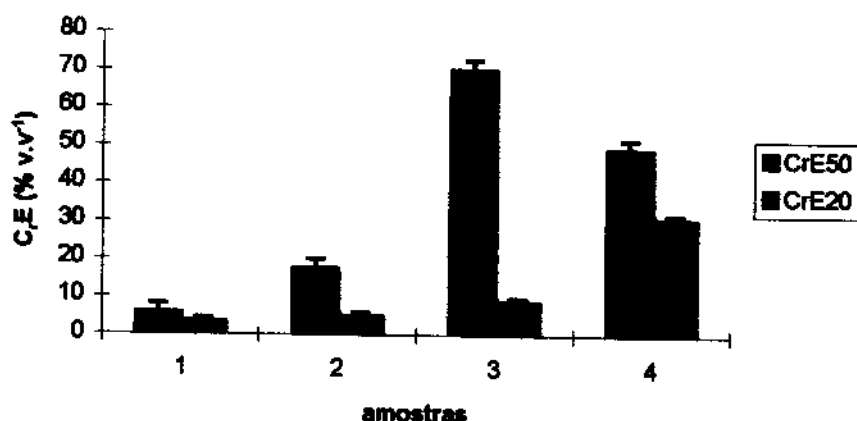


Figura 22: valores de C_E50 e C_E20 dos efluentes da indústria de pectina obtidos pelo teste com a alga *S. subspicatus*.

A correlação entre as C_E50 e C_E20 dos efluentes avaliados frente aos organismos *V. fisheri* e *S. subspicatus* encontram-se nas figuras 23 e 24 respectivamente. Levando-se em consideração que os organismos indicadores pertencem a níveis tróficos diferentes, a correlação obtida entre as CE50 dos dois organismos ($r^2 = 0,9925$) pode ser considerada extremamente elevada, uma vez que, em sistemas biológicos, correlações acima de 0,6 são consideradas altas. Porém, a correlação entre as CE20 dos dois organismos foi baixa ($r^2 = 0,3869$). Compreende-se a diferença entre as correlações de CE50 e CE20 pela observação das curvas concentração-resposta apresentadas no anexo IV.

Sweet e col. (1997) verificaram a correlação entre os ensaios de toxicidade com o invertebrado (*C. dubia*), com o peixe (*P. promelas*) e com o ensaio de toxicidade utilizando o sistema Microtox®. Os autores consideraram significativamente alta a correlação encontrada entre as CE50 da bactéria luminescente e o invertebrado ($r^2 = 0,64$), porém, a correlação entre a bactéria e o peixe foi baixa ($r^2 = 0,26$). Os autores atribuíram a baixa correlação obtida à distância entre os níveis tróficos dos organismos-teste estudados.

Peter e col. (1995) usaram a bactéria luminescente e a alga *S. subspicatus* para investigar a toxicidade de águas residuais de mineração. Os

pesquisadores consideraram muito baixa a correlação entre as respostas obtidas pelos dois organismos.

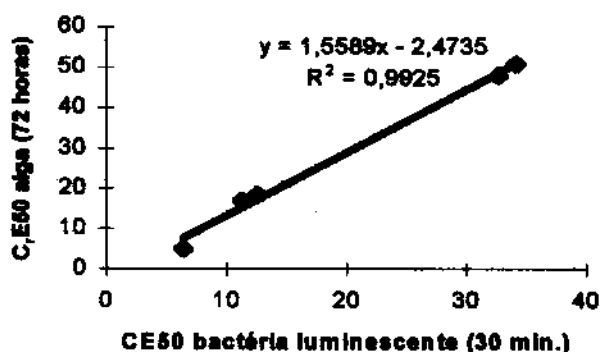


Figura 23: correlação entre as CE50 obtidas pelo teste com alga e com bactéria luminescente.

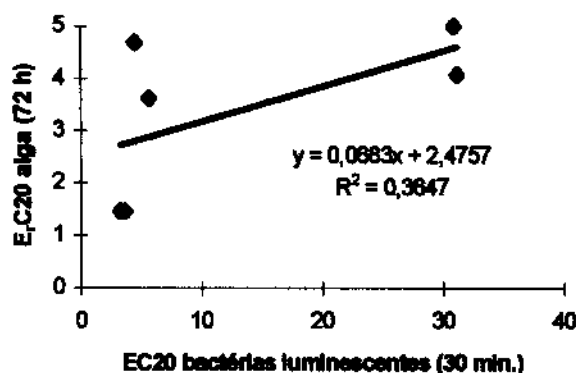


Figura 24: correlação entre as CE20 obtidas pelo teste com alga e com bactéria luminescente.

O critério adotado pela legislação alemã para classificar um efluente como tóxico é a inibição do parâmetro subletal avaliado (crescimento da alga e luminescência da bactéria) maior que 20 %. De acordo com tal critério, os efluentes da indústria de pectina investigados são classificados como tóxicos, tanto à alga, quanto à bactéria luminescente. Segundo a legislação ambiental alemã, esta característica apresentada pelo efluente final da indústria (amostra 4) o torna impróprio para a descarga em corpos receptores.

Tendo em vista a intensa coloração apresentada pelas amostras estudadas (anexo II), suspeitou-se que tal característica pudesse estar

influenciando nos resultados do ensaio de toxicidade com alga, uma vez que apenas o teste com a bactéria luminescente teve esse efeito corrigido. Desse modo, a influência da coloração dos efluentes no teste de toxicidade com alga será discutida no item III.3.

III.2.3- Distribuição da massa molecular dos efluentes

As distribuições das massas moleculares das amostras foram avaliadas utilizando-se a técnica de permeação em gel. Essa técnica baseia-se na comparação dos volumes necessários, sob condições definidas, para a eluição de compostos de massas moleculares conhecidas, com os volumes usados para eluir as amostras estudadas. Para que essa comparação seja possível, foi feita uma curva de calibração com proteínas de massas moleculares conhecidas, conforme apresentada na figura 25. A curva de calibração representa a correlação entre os coeficientes de distribuição das massas moleculares (K_{av}), calculado conforme descrito no item II.2.4, e o logaritmo da massa molecular dos compostos conhecidos. Os volumes de $V_0=90$ mL e $V_t=225$ mL foram obtidos pela eluição da dextrana azul e pelo cálculo do volume total da coluna respectivamente.

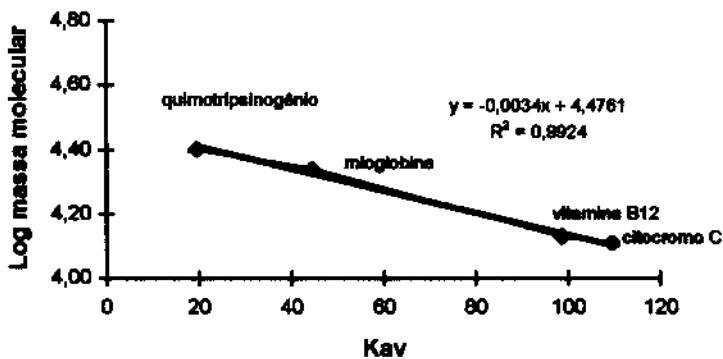


Figura 25: Curva de calibração para a cromatografia de permeação em gel Sephadex G-50

Uma vez obtida a curva de calibração, as amostras estudadas foram aplicadas à coluna e eluídas, monitorando-se a absorvância em 280 nm de cada fração obtida pela eluição das amostras.

Como se verifica na figura 26, as amostras não apresentaram picos definidos, sendo que os volumes de eluição usados no cálculo da distribuição de massa molecular dos efluentes foram as médias dos valores máximos de absorvância em 280 nm. Os baixos valores de absorvância em 280 nm obtidos pela eluição da amostra 4 devem-se, provavelmente, à observação de que parte dessa amostra reteve-se no gel, porém, a eluição da coluna foi encerrada.

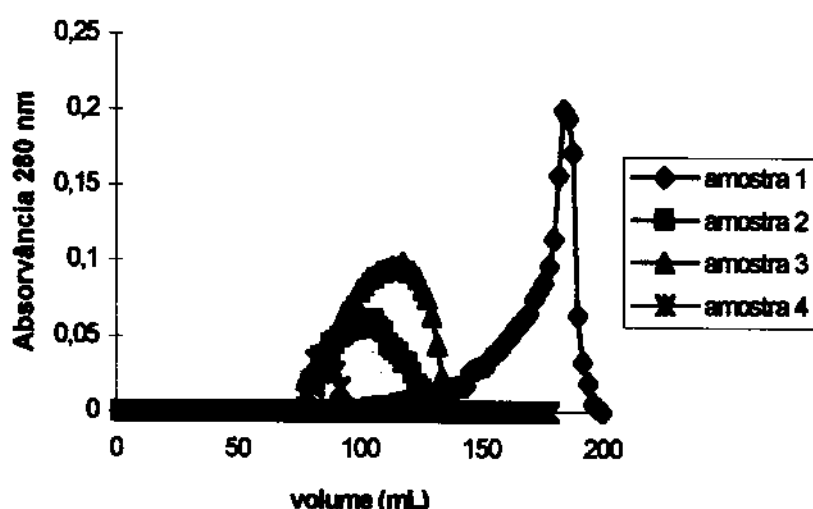


Figura 26: distribuição da massa molecular dos efluentes da indústria de pectina

Como está representado na figura 26, as amostras 2, 3 e 4 possuem distribuição de massa molecular próximas, divergindo na intensidade da absorção em 280 nm. A maior diferença constatada nas distribuições de massas moleculares foi entre a amostra 1 e as demais.

Ao se compararem os volumes necessários para a eluição das amostras (figura 26) com a curva padrão (figura 25), determinaram-se as distribuições de massas moleculares dos efluentes. As médias dos volumes de eluição (V_e) e os

resultados de distribuição da massa molecular das amostras estão apresentadas na tabela 14.

Tabela 14: parâmetros para o cálculo da distribuição da massa molecular dos efluentes da indústria de pectina.

Fração 3	volume de eluição Ve (mL)	Kav	Log massa molecular	massa molecular (kD)
amostra 1	184	0,69	4,16	14,3
amostra 2	115	0,185	4,40	25,02
amostra 3	118	0,20	4,39	24,4
amostra 4	94	0,03	4,47	29,6

Cabe ressaltar que, de acordo com a tabela 14, a distribuição de massa molecular das amostras aumentou a partir da amostra 2, isto é, após a primeira etapa de tratamento, a desnitrificação. A distribuição da massa molecular das amostras 2 e 3, permaneceu praticamente constante, aumentando na amostra 4.

A distribuição de massa molecular de efluentes foi estudada por ultrafiltração por Dahlgren e col. (1995), os quais separaram compostos de diferentes massas moleculares em efluentes de indústria papeleira. Nesse estudo, a distribuição das massa moleculares foi considerada alta sendo que, a maior parte dos compostos separados apresentaram massa entre 1 e 10 kD. Comparando-se os resultados dos pesquisadores com os obtidos nesse trabalho, verificou-se que os efluentes de indústria de pectina estudados apresentaram massas moleculares bastante elevadas, pois os valores situaram-se entre 14,3 e 29,6 kD.

III.2.4- Caracterização dos efluentes por Pirólise-CG-EM

Objetivou-se nessa caracterização comparar qualitativamente os compostos das amostras estudadas pela presença de picos e suas áreas relativas e, se possível, identificar os compostos responsáveis pela toxicidade dos efluentes. Inicialmente, procurou-se caracterizar as amostras apenas por CG-EM porém,

devido ao pequeno número de compostos encontrados nas mesmas foi realizada a pirólise das amostras com o intuito de auxiliar nessa caracterização.

A técnica de Pi-CG-EM vem sendo usada para estudar matrizes orgânicas, principalmente pelo fato de as análises convencionais como DQO, COD e absorvância no UV_{254nm}, serem limitadas ao fornecerem informações quanto à natureza química das substâncias constituintes das matrizes orgânicas (Bruchet e col., 1990). Em estudos de efluentes, essa técnica pode ser útil, tanto para identificar os seus componentes e direcionar o processo de tratamento mais indicado para a remoção de poluentes, quanto para verificar a eficiência de tratamentos aplicados ao efluente pelo desaparecimento de determinadas substâncias (Gray e McAuliffe, 1992; Calvo e col., 1995; Franta e Wildener, 1997).

A pirólise é utilizada em combinação com CG-EM no estudo da estrutura de macromoléculas e biopolímeros pela complexidade e alta massa molecular apresentada por elas. Essa técnica possibilita a fragmentação da macromolécula produzindo uma série de produtos de pirólise de classes químicas diferentes constituintes da macromolécula estudada (Galetti e col., 1996; Göbbels e Püttmann, 1997).

A escolha da temperatura da pirólise depende da fragmentação da amostra. Göbbels e Püttmann (1997) obtiveram fragmentos diferentes usando temperaturas de pirólise de 510 °C e 770 °C para investigar substâncias húmicas de chorume. Na temperatura de 510 °C não foram encontradas unidades aromáticas como produtos de pirólise, apenas alcoóis e ácidos de cadeia longa, os quais foram atribuídos à clivagem térmica de ligações éter e éster ou à evaporação dos mesmos. À temperatura de 770 °C encontraram-se fragmentos aromáticos de pirólise como o benzeno, naftaleno e hidrocarbonetos altamente condensados. Nesse estudo, foi necessário o uso da temperatura de 770 °C para a obtenção de fragmentos de pirólise.

Geralmente, realizam-se os estudos de biopolímeros por pirólise analisando os fragmentos produzidos consoante as suas classes químicas. Nesse sentido, Gray e McAuliffe (1992) estudaram diferentes classes de fragmentos de matrizes orgânicas normalmente encontrados após pirólise e padronizaram os seus compostos característicos, quais sejam: 1) pela pirólise de polissacarídeos foram

encontrados furanos substituídos e ciclopentenonas; 2) de compostos poliaromáticos, derivados fenólicos e benzênicos; 3) de proteínas, compostos nitrogenados; 4) de aminoaçúcares, acetamida. Tal classificação foi utilizada nesse trabalho para auxiliar a interpretação dos pirogramas das amostras estudadas.

Nas figuras de 27 a 30 encontram-se os cromatogramas obtidos após a pirólise das amostras de 1 a 4. A numeração dos picos referentes aos compostos encontrados nas amostras, as suas áreas relativas e as identificações dos compostos, propostas pelo espectro de massa, estão apresentadas na tabela 15 (pág. 77). Os picos não identificados se devem ou a sua baixa abundância na amostra ou à ausência de um espectro de massa padrão similar na biblioteca do SNIST, usada na identificação das substâncias.

Na figura 27, apresenta-se o cromatograma da amostra 1, no qual pode ser observado serem os derivados benzênicos e fenólicos os compostos presentes em maiores proporções (picos nº 3, 6, 12), os pirrólicos (picos nº 4 e 5) e o furanocarboxialdeído (pico nº 7), indicando a presença de compostos poliaromáticos, proteínas e polissacarídeos respectivamente. Uma vez que a amostra 1 representa o efluente que entra no STE, pode-se afirmar que nessa amostra estão incluídos os compostos provenientes da produção da pectina, inclusive da matéria-prima.

Os compostos pirrólicos (picos nº 4 e 5) presentes em maior porcentagem nas amostras 1 e 4 (tabela 15), podem ser provenientes da pirólise do aminoácido prolina, indicando a presença de proteína na estrutura original das amostras (Calvo e col., 1995).

No cromatograma ou pirograma da amostra 2, apresentado na figura 28, verifica-se um maior número de picos (compostos) em relação a amostra 1. Pela identificação dos picos obtidos pela pirólise dessa amostra, não foram encontrados fragmentos originados de polissacarídeos, ou seja, o furanocarboxialdeído (pico nº 7), presente na amostra 1 não foi encontrado na amostra 2. Considerando que a amostra 2 representa o efluente coletado após a primeira etapa do tratamento dos efluentes, os polissacarídeos parecem ter sido degradados nessa etapa, enquanto outros compostos foram encontrados, possivelmente, formados pela ação dos microorganismos presentes no STE.

Na amostra 2, observou-se também uma leve diminuição da área relativa de benzeno (pico nº 3) em relação a amostra 1, porém, outros compostos derivados do benzeno foram encontrados, como por exemplo, o etil-benzeno (pico nº 8), o qual não havia sido detectado na amostra anterior. Esse exemplo reforça a idéia de que os produtos de pirólise são mais bem interpretados observando-se as classes de compostos químicos formados, conforme apresentado na figura 31.

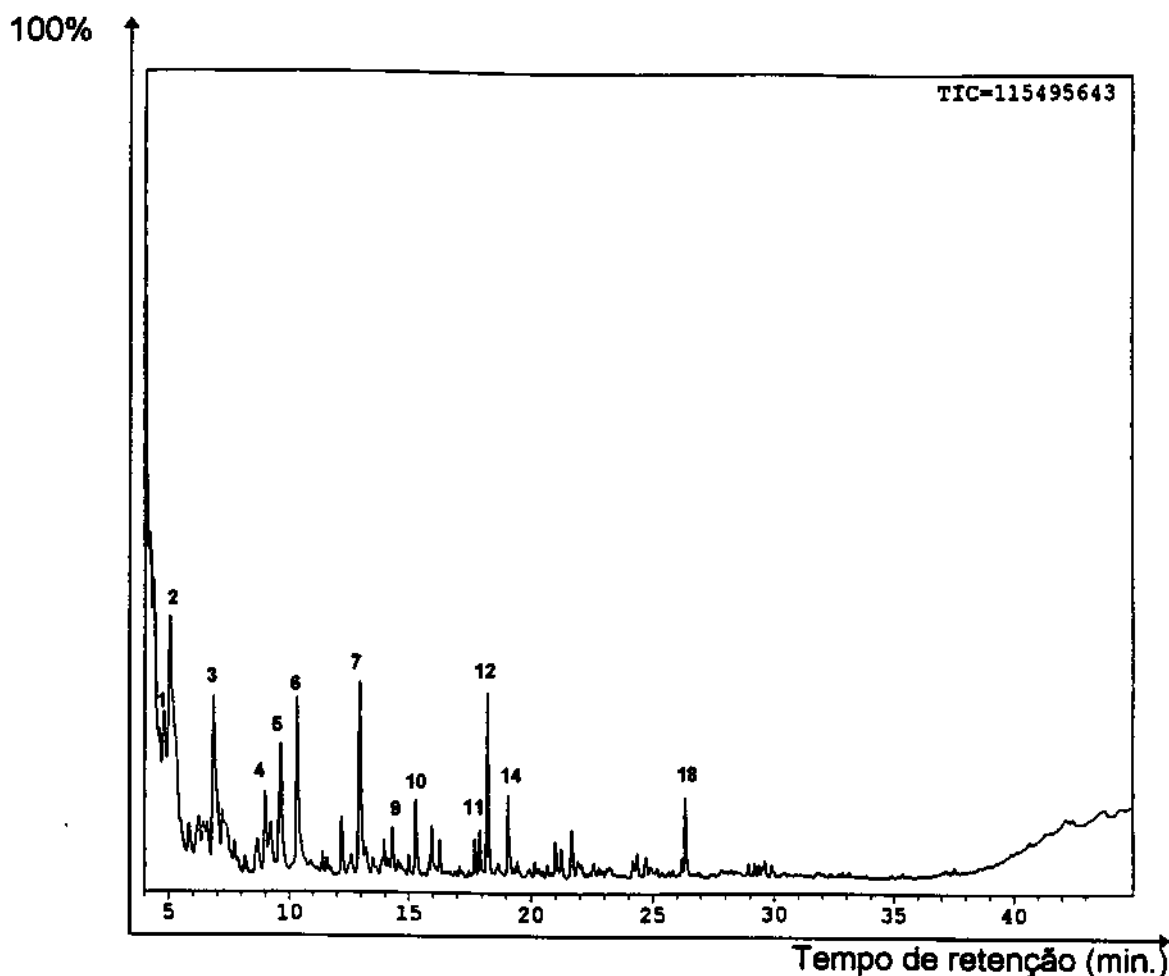


Figura 27: cromatograma da amostra 1 (1) 2-metil-propanonitrila; 2) 1,3-cicloexadieno; 3) benzeno; 4) 1H-metil pirrol; 5) pirrol; 6) tolueno; 7) 2-furanocarboxialdeído; 9) xileno; 10) 1,3,5,7-ciclooctatetraeno; 11) fenol; 12) fenil carbamato; 14) p-cresol; 18) 2-metil-furo (2,3-c)-piridina)

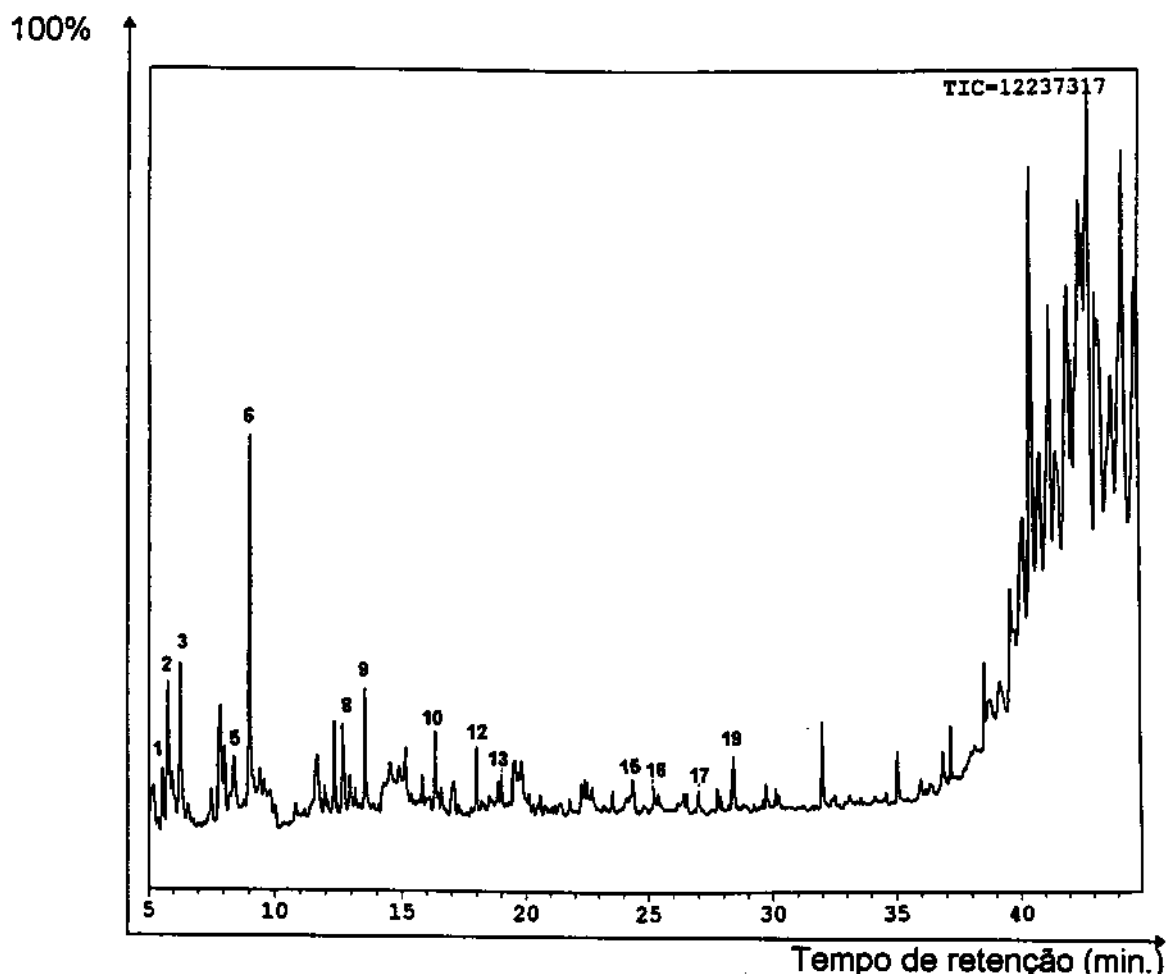


Figura 28: cromatograma da amostra 2 (1) 2-metil-propanonitrila; 2) 1,3-cicloexadieno; 3) benzeno; 5) pirrol; 6) tolueno; 8) etil-benzeno; 9) xileno; 10) 1,3,5,7-ciclooctatetraeno; 12) fenil carbamato; 13) alfa-metilestireno; 15) 2-etil-fenol; 16) 1H-metil-indol; 17) azuleno; 19) metil-naftaleno).

Em termos de classes de produtos formados, os compostos encontrados em maior porcentagem nas amostras 2, 3 e 4 (figuras 28, 29 e 30 respectivamente) foram derivados benzênicos e fenólicos, sendo os principais responsáveis pelo aumento dessa classe de compostos nas amostras identificados como benzeno (pico nº 3), tolueno (pico nº 6) e xileno (pico nº 9). Alguns dos derivados fenólicos encontrados nas amostras estudadas, como o 2-etil-fenol e o tolueno foram detectados no estudo da estrutura da lignina e na composição de efluentes de indústria papeleira por Pi-CG-EM (Calvo e col., 1995; Galletti e col., 1996).

A identificação dos compostos obtidos, proposta pelo espectro de massa e as massas moleculares dos compostos estão apresentados na tabela 15. Os espectros

de massa de alguns compostos, identificados pela comparação com os padrões da biblioteca disponível no equipamento, encontram-se no anexo V.

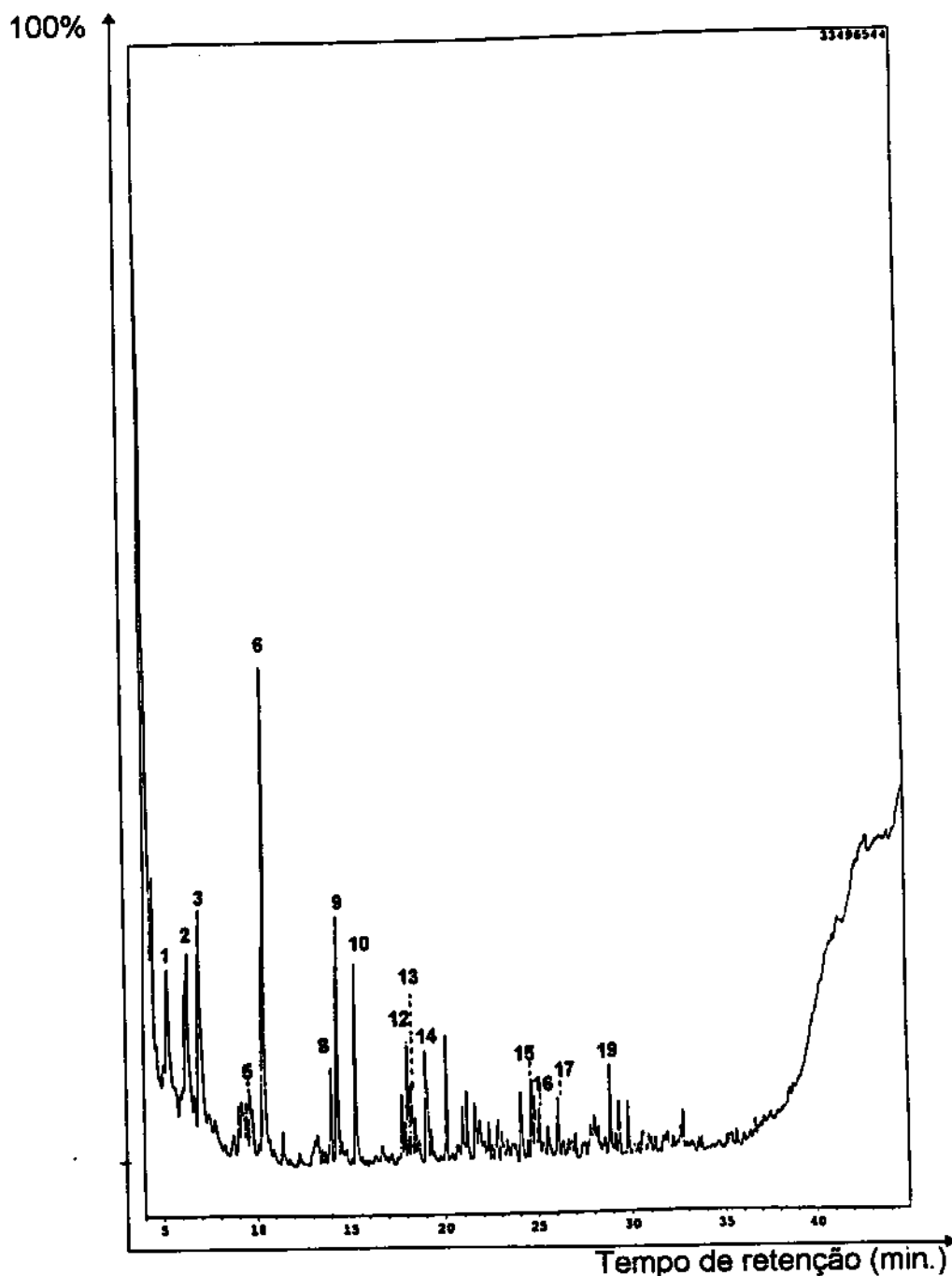


Figura 29: cromatograma da amostra 3 (1) 2-metil-propanonitrila; 2) 1,3-cicloexadieno; 3) benzeno; 5) pirrol; 6) tolueno; 8) etil-benzeno; 9) xileno; 10) 1,3,5,7-ciclooctatetraeno; 12) fenil carbamato; 13) alfa-metilestireno; 14) p-cresol; 15) 2-etil-fenol; 16) 1H-metil-indol; 17) azuleno; 19) metil-naftaleno).

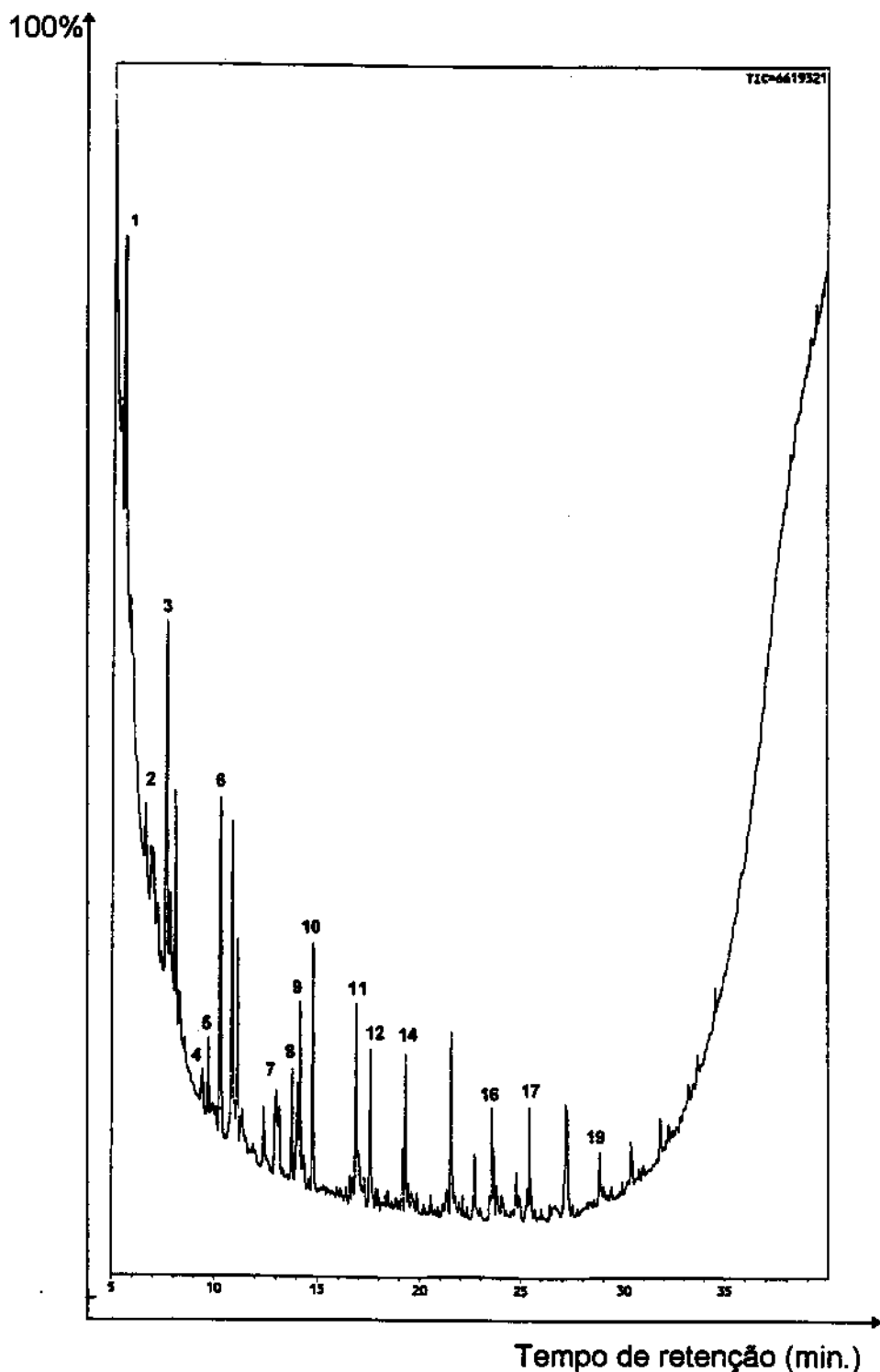


Figura 30: cromatograma da amostra 4 (1) 2-metil-propanonitrila; 2) 1,3-cicloexadieno; 3) benzeno; 4) 1H-metil pirrol; 5) pirrol; 6) tolueno; 7) 2-furanocarboxialdeído; 8) etil-benzeno; 9) xileno; 10) 1,3,5,7-ciclooctatetraeno; 11) fenol; 12) fenil carbamato; 14) p-cresol; 15) 2-etil-fenol; 16) 1H-metil-indol; 17) azuleno; 19) metil-naftaleno).

Tabela 15: área relativa dos compostos encontrados nas amostras da indústria de pectina por Pi-CG-EM.

Identificação proposta dos fragmentos	nº do pico	massa molecular	área relativa dos compostos (%)			
			1	2	3	4
2 metil-propanonitrila *	1	69	2,50	1,50	7,03	4,93
1,3-cicloexadieno *	2	80	9,41	14,57	11,64	2,05
benzeno *	3	78	14,58	15,30	14,07	18,98
1H-metil pirrol	4	81	3,16	-	-	1,36
pirrol *	5	67	5,95	2,48	1,30	1,52
tolueno *	6	92	15,10	31,92	29,82	24,69
2-furanocarboxialdeído *	7	96	18,85	-	-	2,31
etil-benzeno *	8	106	-	6,18	2,28	2,86
xileno*	9	106	1,88	7,02	12,92	4,41
1,3,5,7-ciclooctatetraeno *	10	104	2,15	5,50	8,87	6,69
fenol	11	94	1,25	-	-	5,88
fenil carbamato *	12	137	17,56	5,30	2,81	4,21
alfa-metilestireno	13	118	-	1,15	1,5	-
p-cresol	14	108	1,74	-	2,66-	4,46
2-etil-fenol	15	122	-	1,39	1,74	-
1H-metil-indol *	16	130	-	0,82	1,03	3,45
azuleno *	17	128	-	1,04	1,31	3,17
2-metil-furo (2,3-c)-piridina	18	107	2,04	-	-	-
metil-naftaleno *	19	142	-	3,01	2,13	2,82

* o espectro de massa do composto e a comparação com o espectro da biblioteca do SNIST está apresentada no anexo V.

Observando-se os resultados apresentados na tabela 15, os fragmentos obtidos foram divididos em 3 classes principais de produtos de pirólise, segundo a classificação de Gray e McAuliffe (1992), exceto o cicloexadieno (pico nº 2), o ciclooctatetraeno (pico nº 10) e o azuleno (pico nº 17), os quais não pertencem as classes propostas pelos autores, quais sejam:

- 1) compostos fenólicos e derivados benzênicos (picos nº 3, 6, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 19) os quais indicam a presença, principalmente, de compostos poliaromáticos na estrutura original do efluente;

- 2) furanos e ciclopentenonas derivados de polissacarídeos (pico n° 7);
- 3) compostos contendo nitrogênio como os derivados do pirrol (picos n° 1, 4, 5, 18), sugerindo a presença de proteína.

As 3 classes principais de produtos de pirólise encontradas nas amostras estão representadas na figura 31 em termos de área relativa.

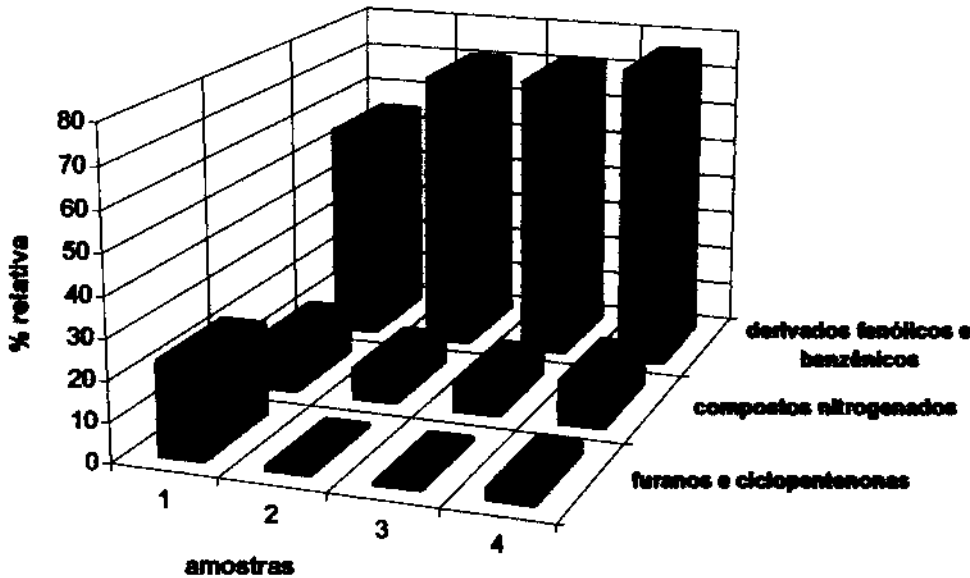


Figura 31: principais classes de fragmentos de pirólise encontrados nas amostras da indústria de pectina.

Segundo a classificação de Gray e MacAuliffe (1992), pode-se observar na figura 31 que os derivados fenólicos e benzênicos representam mais de 70 % das classes de compostos identificadas nas amostras 2, 3 e 4 sugerindo a origem poliaromática dessas amostras. No entanto, Saiz-Jimenez (1994) alerta que os produtos de pirólise, aromáticos e cíclicos, podem ser artefatos de reações de ciclização de subunidades alifáticas, produzidos durante a pirólise por reações secundárias.

Embora exista essa dificuldade na interpretação dos resultados obtidos por pirólise no estabelecimento da estrutura química original da macromolécula, a baixa biodegradabilidade, principalmente da amostra 4 (revelada pela baixa relação DBO_5/DQO), fortalece a idéia de que a natureza do efluente seja poliaromática.

Além disso, uma hipótese provável é que esses compostos tenham sido formados pela ação dos microorganismos componentes do lodo responsáveis pelo tratamento dos efluentes. Frølund e col. (1996) estudaram a composição dos polímeros extracelulares de lodo ativado e encontraram como principais componentes: proteínas, compostos tipo-húmicos, carboidratos e ácidos urônicos. A formação de biopolímeros, como as substâncias tipo-húmicas, durante as etapas de tratamento de efluentes pelos organismos constituintes do lodo ativado, esclareceria a estrutura poliaromática dos efluentes.

É improvável que substâncias tóxicas como o benzeno e o tolueno estejam presentes como espécies livres nos efluentes, pois estes não foram utilizados na produção da pectina e a formação deles durante as etapas do STE, acarretaria no prejuízo dos próprios microorganismos componentes do lodo. A partir dessa observação, pode-se admitir a forte contribuição desses fragmentos para a natureza poliaromática dos efluentes.

Convém destacar ainda que a partir da primeira etapa do tratamento de efluentes - a desnitrificação (amostra 2) - foi observado tanto o aumento relativo da aromaticidade das amostras quanto o aumento das distribuições das massas moleculares (item III.2.3).

Em resumo: a identificação dos fragmentos obtidos por pirólise revelou que os constituintes dos efluentes são poliaromáticos, possivelmente em decorrência de reações mediadas por organismos presentes no STE, tendo sido identificado um aumento em torno de 20 % da aromaticidade após a primeira etapa do STE. Porém, os produtos aromáticos encontrados podem ser apenas artefatos da pirólise.

III.2.5- Conclusões parciais

As amostras da indústria de pectina estudadas, nos volumes adicionados, não mostraram-se tóxicas à população de microorganismos componentes do lodo utilizado como indicador.

Todas as amostras apresentaram toxicidade ante a bactéria luminescente e a alga, sendo que a CE50 obtida pelos testes com os dois organismos mostrou a redução da toxicidade com a evolução das etapas do STE, o qual voltou a aumentar após a última etapa do STE, ou seja, no efluente final da indústria. Considerando as CE20 obtidas pelo ensaio com algas, a toxicidade dos efluentes diminuiu com as etapas de tratamento dos efluentes.

As distribuições das massas moleculares dos efluentes da indústria produtora de pectina foram relativamente elevadas. A partir da amostra 2 foi observado um aumento na distribuição da massa molecular dos efluentes permanecendo até o efluente final.

O estudo das amostras por Pi-CG-EM indicou a composição poliaromática das mesmas.

III.3- USO DO ENSAIO DE TOXICIDADE COM ALGA PARA AVALIAÇÃO DE EFLUENTES E ÁGUAS DE AMBIENTES NATURAIS DE COLORAÇÃO "ESCURA"

Esse estudo foi motivado pela necessidade apontada no item III.2 de investigar as possíveis interferências causadas pela coloração dos efluentes no resultado do ensaio de toxicidade com alga.

Além do efluente final da indústria de pectina (amostra 4) estudado no item III.2, foram coletadas águas de ambientes naturais (pântanos sem interferência antropogênica), lixívia de resíduos sólidos (chorume) e outros efluentes líquidos industriais, em que o critério de escolha para estas amostras foi a presença de coloração escura. Foram utilizadas também soluções de substâncias húmicas (SH) comerciais, por apresentarem cor marrom característica e, por informações obtidas na literatura de que substâncias tipo-húmicas sejam responsáveis pela coloração de amostras de águas superficiais (MacCarthy e Suffet, 1989), de alguns efluentes industriais (Dahlman e col. 1995; Agbekodo e col., 1997; Matsché e Stumwöhrer, 1997) e de chorume (Miikki e col., 1997). Porém, não foi realizado nenhum estudo físico-químico com o objetivo de investigar a composição das amostras ou identificar as substâncias responsáveis pelas suas colorações.

Nesse estudo, desejou-se avaliar a(s) interferência(s) que as colorações dessas amostras podem causar no resultado do ensaio de toxicidade com algas e, caso necessário, eliminá-la(s) pela proposta de uma modificação do método. Nesse sentido, as investigações foram conduzidas de acordo com duas hipóteses lançadas em relação ao problema:

1. as amostras de "coloração escura" absorvem a luz fornecida para o crescimento da alga inibindo o seu crescimento sendo que a iluminação fornecida no ensaio não é suficiente para o crescimento máximo da alga;
2. os métodos utilizados para a determinação da concentração da alga sofrem interferências pela coloração apresentada pelas amostras.

III.3.1- Caracterização espectrofotométrica das amostras

Para caracterizar as amostras utilizadas nesse estudo, as quais apresentavam visualmente uma coloração que variava do amarelo ao marrom de diversas tonalidades, foram obtidos espectros de absorção na faixa do ultra violeta e visível (UV-Vis), entre 200 e 700 nm, apresentados na figura 32.

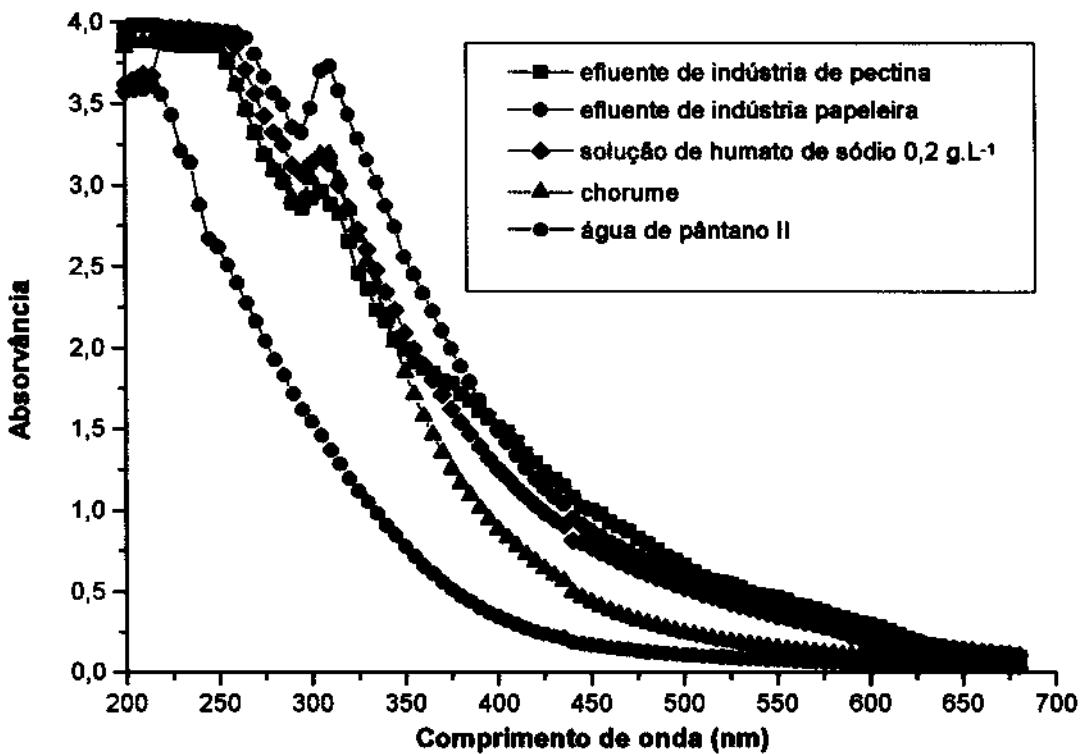


Figura 32: espectros de absorção UV-Vis das amostras de coloração escura estudadas

Observando-se a figura 32, verifica-se uma semelhança entre os perfis espectrofotométricos das amostras estudadas, principalmente na faixa do espectro visível onde nenhum pico de absorção é encontrado (os espectros das SH Fluka e Roth e pântano I não encontram-se apresentadas na figura 32, porém, possuem perfis idênticos às soluções de humato de sódio e pântano II respectivamente). O efluente de indústria papelreira, a solução de humato de sódio 0,2 g.L⁻¹ e o chorume apresentaram espectros de absorção bem semelhantes.

As amostras não exibiram picos de absorção máxima bem definidos, no entanto, na faixa do UV pode ser observado um pequeno pico de absorção em torno de 300 nm para todas as amostras, exceto para a amostra de pântano II.

Segundo a literatura, os espectros de absorção característicos das SH podem apresentar um leve máximo de absorção em torno de 300 nm sendo que, após esta faixa, exibem uma lenta diminuição da absorção com o aumento do comprimento de onda (MacCarthy e Suffet, 1989; Corin e col., 1996; Soerensen e col., 1996). Essa característica foi observada nos espectros de absorção de todas as amostras estudadas.

Em trabalhos de caracterização de efluentes a absorção no UV é utilizada por alguns pesquisadores para indicar a concentração de carbono orgânico dissolvido (COD), sendo os comprimentos de ondas mais comuns para este tipo de estudo, 254 nm (Corin e col., 1996), 260 nm (Soerensen e col., 1996) e 280 nm (Bekboelet e col., 1996).

Na região do Vis, as informações mais importantes para o estudo de amostras "escuras" podem ser obtidas nos comprimentos de onda em torno de 400 nm (400-465 nm) (Abbt-Braun e col., 1990; Stevenson, 1994).

De posse dessas características das amostras foram estudadas as interferências que as colorações das mesmas podem causar no ensaio de toxicidade com algas.

III.3.2- Interferência(s) no crescimento da alga em função da absorção de luz pelas amostras "escuras"

Levando-se em consideração que a energia luminosa absorvida para a realização da fotossíntese é a da luz emitida na faixa de luz visível, entre 400 e 700 nm, normalmente denominada de irradiação fotossinteticamente ativa (IFA) (Kirk, 1994), supõe-se que as amostras que absorvam luz nessa faixa de comprimento de onda possam interferir no crescimento da alga. Para ilustrar essa possibilidade, na figura 33 encontram-se sobrepostos os espectros de absorção de uma suspensão da alga *S. subspicatus* e de uma solução de SH (Roth) 0,2 g.L⁻¹.

Tendo em vista a semelhança entre os espectros de absorção das amostras estudadas (figura 32), assumiu-se que a interferência causada pela absorção de luz no crescimento da alga seja semelhante, diferenciando-se apenas na intensidade de absorção de cada amostra avaliada.

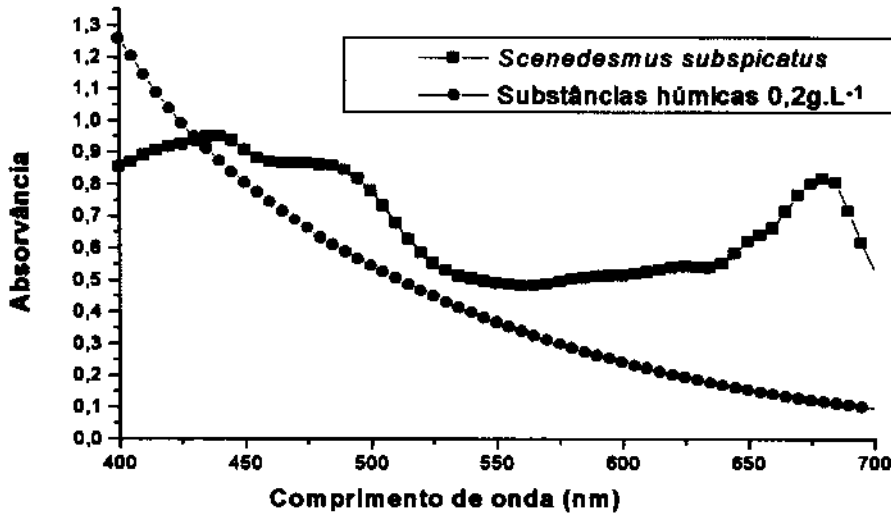


Figura 33: espectro de absorção das substâncias húmicas 0,2 g.L⁻¹ e da alga *S. subspicatus* entre 400 e 700 nm.

O perfil espectrofotométrico apresentado pela suspensão da alga (figura 33) é, basicamente, o da clorofila *a*, a qual exibe uma banda típica de absorção em 435 nm e em torno de 680 nm, as quais indicam os comprimentos de onda mais importantes para a fotossíntese (Kohl e Nicklisch, 1988).

Com base nas observações acima descritas e com as informações da literatura relacionadas no item I.3, pode-se afirmar que, em termos de luz, os fatores que influenciam no crescimento da alga estão relacionados com a distribuição espectral da luz (energia) e com a quantidade de irradiação (figura 3, pg. 20) fornecida à alga (Schwoerbel, 1993).

a) Influência da distribuição espectral da luz

Quanto à distribuição espectral da luz, a maioria dos ensaios de toxicidade recomendam o uso de luz do tipo branca universal, podendo o fluxo luminoso variar de 6000 a 10000 Lux ou $60 - 120 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, ou ainda, $35 - 70 \times 10^{18}$ fótons. $\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (ISO 1989, DIN, 1991). Porém, a norma da ABNT (NBR 12648) sugere o uso de $5000 \text{ Lux} \pm 10 \%$ sem mencionar o tipo de luz a ser utilizada.

Nesse trabalho foram comparados dois tipos de lâmpadas com espectros de emissão distintos (anexo III), quais sejam: a luz branca universal e a luz diurna (OSRAM).

Na figura 34 encontram-se representados o crescimento da alga em controles (condições descritas no item II.1.1) sob diferentes intensidades luminosas utilizando a luz branca universal e a luz diurna. Enquanto que a taxa de crescimento da alga com a luz branca universal permaneceu praticamente constante sob iluminações entre 4000 e 10000 Lux, pela utilização da luz diurna não foi encontrada uma faixa de iluminação onde o crescimento da alga fosse constante (saturação de luz), e sim um aumento do crescimento da alga com o aumento da iluminação. Além desse efeito, as taxas de crescimento da alga obtidas pelo uso da luz diurna foram aproximadamente 30 % menores quando comparadas às taxas obtidas pelo uso da luz branca universal. Essa diferença entre as respostas do crescimento da alga em relação à fonte luminosa está relacionada com as distribuições espectrais das lâmpadas (anexo III).

Considerando-se que para esse trabalho foi medida a iluminação (Lux) e não a energia disponível à alga para a realização da fotossíntese, pode-se entender que, apesar da iluminação ser a mesma para ambas as lâmpadas, a energia da luz diurna é inferior. A unidade Lux, apesar de ser aceita internacionalmente como unidade de iluminação, é um termo visual baseado apenas no fluxo luminoso por unidade de área. Isso significa não ser possível a conversão exata de Lux em unidades de energia ($\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) (Kirk, 1994). Mesmo apresentando tal limitação, a unidade Lux continua sendo utilizada e é uma das mais encontradas na literatura relacionada com ensaios com algas. Para exemplificar, no trabalho realizado por Comber e col. (1995) recomenda-se o uso de 16000 Lux para a avaliação da

toxicidade de amostras coloridas, porém os autores não mencionaram o tipo de luz usada no referido estudo. Pelo uso de luz branca universal essa iluminação, provavelmente, causaria inibição do crescimento da alga *S. subspicatus*.

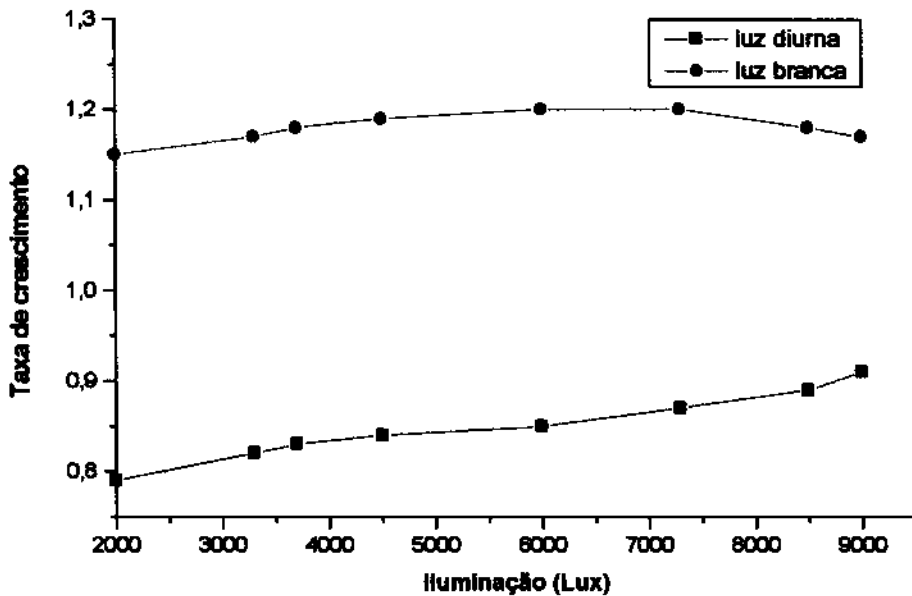


Figura 34: crescimento da alga *S. subspicatus* sob diferentes intensidades de iluminação usando a luz branca universal e a luz diurna

Para amostras escuras, como representado na figura 35 pela solução de SH 0,1 g.L⁻¹ (Roth), o uso de luz tipo-branca universal e diurna apresentou uma diferença ainda maior entre as taxas de crescimento quando intensidades luminosas iguais foram comparadas. Por exemplo, em 7000 Lux, a taxa de crescimento da alga com a luz diurna foi aproximadamente 60 % menor que a taxa obtida com luz branca. Esses experimentos revelam a importância da observação do tipo de luz utilizada para o ensaio com algas.

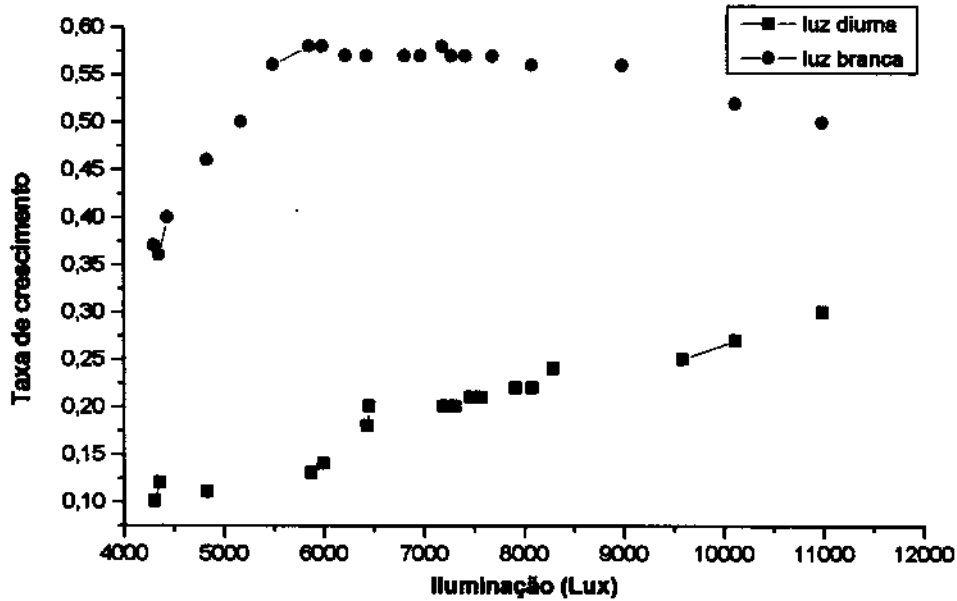


Figura 35: crescimento da alga *S. subspicatus* em solução de SH 0,1 g.L⁻¹ sob diferentes intensidades de iluminação usando luz branca universal e luz diurna.

b) Influência da iluminação

Para verificar a relação entre a iluminação e o crescimento da alga *S. subspicatus* baseado na teoria da saturação de luz, conforme representado na figura 3 (pg. 20), foram realizadas curvas de crescimento da alga em função de diferentes intensidades de iluminação as quais estão representadas nas figuras 36, 37 e 38. A partir dessas curvas foram obtidas as faixas de iluminação necessárias para o crescimento máximo da alga em cada uma das amostras estudadas. Assim, pretendia-se eliminar a possibilidade de ter sido insuficiente a luz fornecida às algas, pois seria absorvida pelas amostras escuras.

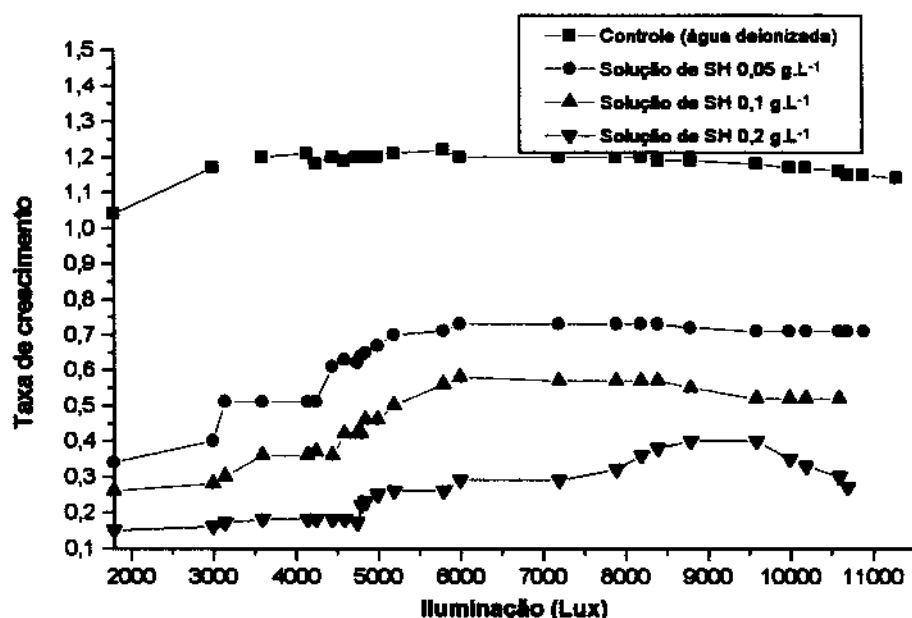


Figura 36: crescimento da alga em soluções de SH (Roth) sob diferentes intensidades de iluminação.

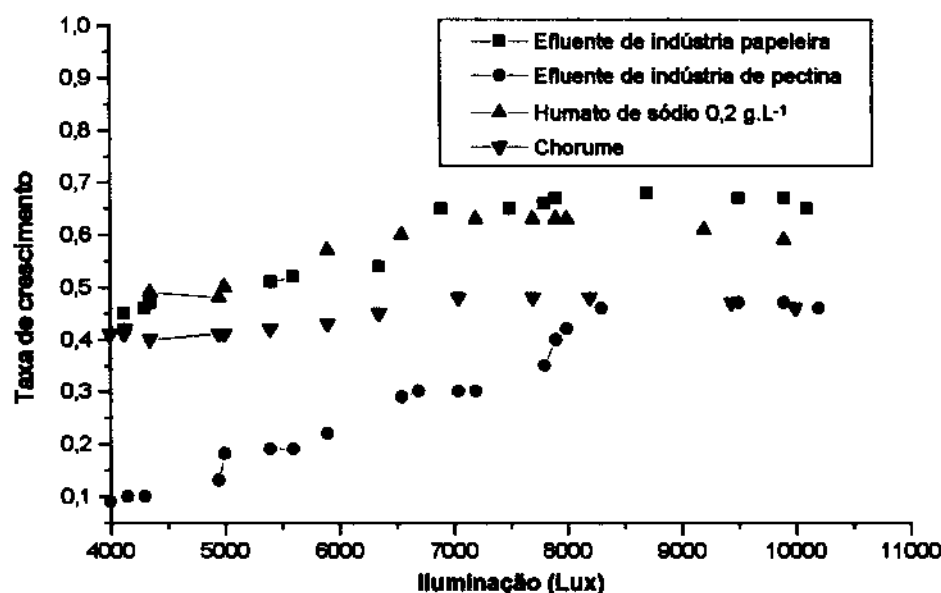


Figura 37: crescimento da alga em amostras de efluentes industriais, humato de sódio 0,2 g.L⁻¹ (Roth) e chorume sob diferentes intensidades de iluminação.

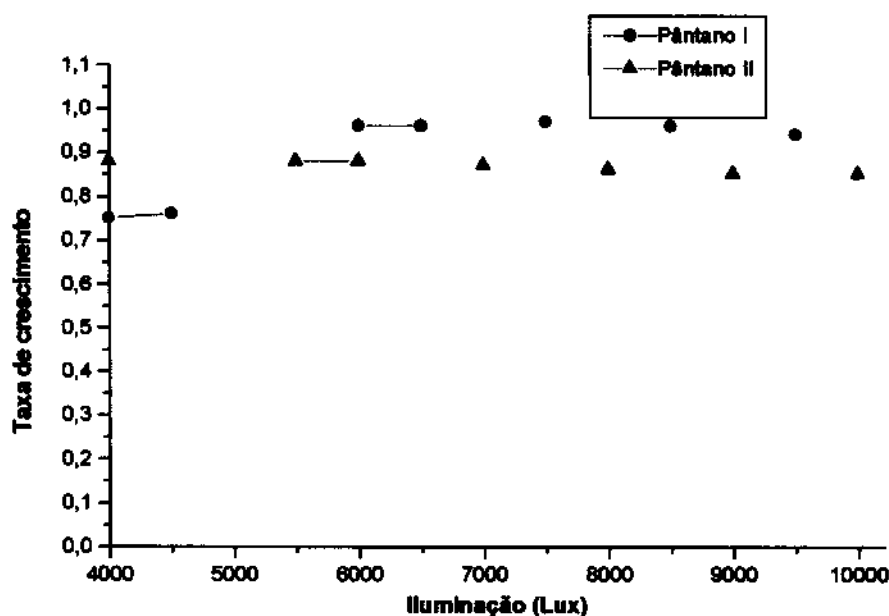


Figura 38: crescimento da alga em águas de pântano sob diferentes intensidades de iluminação

De acordo com essas curvas foi construída a tabela 17, onde encontram-se relacionadas as faixas de iluminação nas quais, segundo as condições do experimento realizado, obteve-se o crescimento máximo da alga nas amostras avaliadas.

A maior parte das faixas de saturação obtidas para as amostras estudadas correspondem a faixa de intensidade luminosa recomendada pelos testes oficiais para a realização do ensaio, isto é, entre 6000 e 10000 Lux. Porém, para as amostras mais escuras, como por exemplo SH 0,2 g.L⁻¹ (Roth) e efluente de indústria de pectina, o fornecimento de 9000 Lux promoveu um aumento de aproximadamente 40 % na taxa de crescimento da alga quando comparado ao crescimento da alga em 6000 Lux. Para a amostra de indústria papaleira e a solução de humato de sódio 0,2 g.L⁻¹ constatou-se um aumento em torno de 20 % da taxa de crescimento da alga com o aumento de 6000 para 7000 Lux. Tais diferenças podem influenciar no resultado do ensaio de toxicidade.

Tabela 17: faixas de saturação de luz para o crescimento da alga *S. subspicatus* de acordo com a coloração apresentada pelas amostras.

Amostra	Cor (Abs _{436 nm})	Saturação de Luz (Lux)
controle (água deionizada)	0,00	4000-10000
SH 0,2 g.L ⁻¹ (Roth)	1,151	8000-10000
SH 0,1 g.L ⁻¹ (Roth)	0,641	6000-10000
SH 0,05 g.L ⁻¹ (Roth)	0,268	6000-10000
humato de sódio 0,2 g.L ⁻¹ (Roth)	0,911	7000-10000
efluente final de indústria de pectina	1,094	8000-10000
efluente final de indústria papeleira	0,831	7000-10000
amostra de pântano I (Rhauderfehn)	0,213	5000-10000
amostra de pântano II (Blissendorf)	0,169	5000-10000
amostra de chorume	0,569	6000-10000

Em resumo: os resultados obtidos indicaram que a faixa de iluminação sugerida pelos testes oficiais com algas foi válida para a maior parte das amostras estudadas. Contudo, quando deseja-se avaliar a toxicidade de amostras "escuras", são requeridas intensidades luminosas mais elevadas. Para as amostras que apresentaram Abs_{436 nm} maior que 0,8, observou-se a necessidade de aumentar a intensidade luminosa sugerida pelos testes com alga. A estipulação de 8000 Lux com luz branca universal como intensidade luminosa mínima para a realização do ensaio com alga eliminaria este problema.

III.3.3- Interferência da coloração das amostras no método para a determinação da concentração da alga

A fim de se verificar a influência do método de determinação da concentração da alga para avaliar as amostras "escuras" compararam-se a fluorescência

(λ_{ex} 435nm e λ_{em} 685nm), isto é, a determinação da clorofila *a in vivo* e a extração de clorofila *a* ou a determinação da clorofila *a in vitro*. Como não foi possível calcular a CE50, foram comparados os resultados de inibição do crescimento da alga nas amostras não diluídas. As médias dos resultados obtidos por esses métodos com seus desvios padrões estão apresentados na tabela 18; nesse caso, os valores negativos representam a estimulação do crescimento da alga.

Tabela 18: Porcentagem de inibição do crescimento da alga *S. subspicatus* em amostras "escuras" determinada pela clorofila *a in vivo* e *in vitro*

Amostra	Clorofila ^{a)} <i>in vivo</i>	Clorofila <i>in vitro</i>
SH 0,2g.L ⁻¹ (Roth)	86,47 ± 1,65	15,22 ± 4,30
SH 0,1g.L ⁻¹ (Roth)	62,19 ± 1,57	-0,41 ± 1,34
humato de sódio 0,2 g.L ⁻¹ (Roth)	79,53 ± 2,14	19,05 ± 6,52
efluente final de indústria de pectina	49,60 ± 1,62	-32,57 ± 4,39
efluente final de indústria papeleira	nd	-9,58 ± 6,15
CuCl ₂ (0,6 mg Cu total.L ⁻¹)	64,22 ± 0,97	53,07 ± 5,76

nd= não determinado ^{a)} testes realizados no NLO, segundo a norma alemã "DIN 38402 Teil 38".

Como previamente descrito no item I.2, alguns autores alertam para a possibilidade de variação do resultado da toxicidade dependendo do método usado para determinar a concentração de alga (Abdel-Hamid e col., 1993; Caux e col.,1996). Considerando ter sido elevada a correlação entre fluorescência e extração da clorofila *a* para a medir concentração algácea (item III.1.1 pg. 43 e 44), esperava-se que os resultados obtidos por esses métodos fossem semelhantes, porém, percebe-se a discrepância entre os resultados aqui comparados.

De acordo com os dados apresentados na tabela 18, as respostas das amostras avaliadas variaram entre tóxica e estimulativa. Comparando-se o resultado de toxicidade do efluente da indústria de pectina obtido no item III.2.2 por absorvância em 680 nm (fornecimento de 6000 Lux com luz branca universal), com

os resultados obtidos por fluorescência e extração de clorofila, observa-se que: enquanto que, pela absorvância e fluorescência foi verificada a inibição de aproximadamente 50 % do crescimento da alga em 100 % de amostra (v.v⁻¹), pela extração da clorofila o crescimento foi estimulado em 32,57 %.

Um ponto importante a ser ressaltado é que, na realização do teste por fluorescência segundo a norma alemã "DIN 38402 Teil 38", não foi feito um controle das amostras (sem alga) para verificar se essas emitem fluorescência em 685 nm.

A alternativa utilizada nesse trabalho à fluorescência foi a extração da clorofila *a* a qual é usada por alguns autores, além de ser sugerida em testes oficiais como um dos métodos para medir a concentração algácea (Madsen, 1984; ISO, 1989; Zargorc-Koncan, 1996; Mayer e col., 1997).

Os resultados de toxicidade obtidos, por fluorescência e extração de clorofila, para a solução usada como padrão de toxicidade (0,6 mg Cu total.L⁻¹), na qual não houve interferência da coloração das amostras, foram similares. Esse resultado indica que mesmo que a medida final da extração da clorofila seja feita pela leitura da absorvância em 665 nm, a fluorescência e a extração da clorofila parecem fornecer respostas de toxicidade semelhantes.

Recentemente, Mayer e col. (1997) sugeriram um método automatizado do teste com algas, no qual a extração da clorofila *a* por dimetilsulfóxido/acetona foi utilizado como parâmetro indicador de toxicidade. Os autores apontam que a maior vantagem da extração da clorofila *a* sobre a determinação da clorofila *in vivo* é que a extração pára a transferência de elétrons e outros processos bioquímicos com os quais a clorofila está envolvida, proporcionando maior estabilidade e sensibilidade da resposta.

Considerando-se os resultados obtidos nesse estudo pode-se admitir que: apesar da reconhecida importância do ensaio de toxicidade com algas, este deve ser utilizado com cautela, principalmente levando-se em consideração as características das amostras, para não incorrer em resultados "falso-positivos", isto é, que toxicidade seja atribuída à amostra simplesmente pelo método ser usado de forma inadequada.

III.3.4- Conclusões parciais

As amostras aqui estudadas possuem espectro de absorção semelhantes e absorvem luz necessária ao crescimento da alga.

A distribuição espectral da luz influencia fortemente no crescimento da alga e, portanto, o tipo de luz usada no ensaio com alga deve ser cuidadosamente observada, principalmente, quando se utiliza a unidade Lux como referência.

A faixa de iluminação sugerida pela norma ISO 8692 do teste com algas, entre 6000 e 10000 Lux mostrou-se suficiente para o crescimento máximo da alga na maioria das amostras estudadas. Contudo, quando se deseja avaliar amostras "escuras", é necessário o fornecimento de intensidade de iluminação maior que 6000 Lux (dependendo da coloração da amostra), a fim de se alcançar o crescimento máximo da alga. Esse estudo revelou que o estabelecimento de 8000 Lux com luz branca universal como iluminação mínima seria apropriado para a avaliação de amostras "escuras".

Os parâmetros relacionados com luz sugeridos pela norma técnica da ABNT para o ensaio com algas (5000 Lux $\pm$ 10 % sem mencionar o tipo de luz) podem acarretar em erros na determinação da toxicidade, principalmente quando amostras "escuras" são avaliadas.

A discrepância entre os resultados de toxicidade obtidos por fluorescência e extração da clorofila *a* mostraram a importância da escolha do método para a determinação da concentração da alga em função das características das amostras e do crescimento da alga nas mesmas. A determinação da clorofila *in vitro* parece ser o mais apropriado por eliminar a provável interferência causada pela coloração das amostras. Porém, um maior número de amostras, incluindo outros padrões de toxicidade devem ser testados antes de se concluir que este seja o método mais adequado.

O ensaio de toxicidade com alga proposto pela norma alemã, a qual sugere a fluorescência da clorofila *a* como única alternativa para a medida da alga, pode ser considerado limitado para a avaliação de amostras "escuras" e um controle das amostras é essencial.

IV- CONCLUSÕES GERAIS

Considerando-se os objetivos gerais definidos no início do trabalho, após os estudos realizados pode-se concluir que:

- existem diferenças entre os métodos padronizados com a alga *S. subspicatus* não sendo possível a comparação entre os resultados obtidos pelos mesmos;
- as informações obtidas pelo estudo de efluentes industriais usando análises físico-químicas e ensaios de toxicidade reforçaram a idéia de que esses devem ser usados em combinação. Enquanto as análises físico-químicas realizadas não forneceram informações a respeito da toxicidade dos efluentes industriais estudados, os ensaios com dois organismos indicadores distintos revelaram o potencial tóxico dos mesmos;
- o ensaio com a alga *S. subspicatus* apresenta limitações quando se deseja avaliar amostras "escuras". A iluminação mínima recomendada pelos ensaios de toxicidade, ou seja, 6000 Lux, é insuficiente para avaliar amostras que apresentam $Abs_{436nm} > 0,8$. Além disso, a coloração das amostras pode interferir na determinação da concentração da alga. A extração de clorofila parece ser adequada para a avaliação da toxicidade de amostras escuras por eliminar as possíveis interferências do meio onde a alga se encontra.
- os resultados desse estudo demonstraram que os testes de toxicidade com alga, mesmo padronizados, não são utilizados com cautela e que uma padronização internacional mais detalhada, levando-se em consideração as características das amostras a serem avaliadas, é necessária.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abalde, J.; Cid, A.; Reiriz, S.; Torres, E.; Herrero, C. (1995). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 54, 317-324.
- Abbt-Braun, G.; Frimmel, F.H.; Schulten, H.-R. (1990). *Vom Wasser*, 74, 325-338.
- Abdel-Hamid, M.; Shaaban-Dessouki, S.A.; Skulberg, O.M. (1993). *Environ. Toxicol. Wat. Qual.: An Int. Journal*, 8, 239-254.
- ABTN (1992). Ensaio de toxicidade com *Chlorella vulgaris* (Chlorophyceae), (NBR12648), CEET.
- Agbekodo, K.M.; Huck, P.M.; Andrews, S.A.; Peldszus, S. (1997). *Wat. Qual. Res. J. Can.*, 32, 795-813.
- APHA (1992). Standards Methods for Examination of Water and Wastewater.
- Araújo, R.P.A. (1990). *Ciência e Cultura*, 42, 750-758.
- Araújo, R.P.A.; Bertoletti, E.; Ramos, M.L.L.C.; Gherardi-Goldstein, E.; Martins, M.H.R.B. (1991). *Ciência e Cultura*, 43, 299-303.
- Arensberg, P.; Hemmingsen, V.H.; Nyholm, N. (1996). *Chemosphere*, 30, 103-115.
- Assami, M.; Suzuki, N.; Nakanishi, J. (1996). *Wat. Sci. Tech.*, 33, 121-128.

Bailey, H.C.; Young, L. (1997). *Wat. Sci. Tech.*, 35, 305-313.

Banat, I.M.; Nigam, P.; Singh, D.; Marchant, R. (1996). *Bioresource Technology*, 58, 217-227

Bassoi, L.J.; Nieto, R.; Tremaroli, D.; Bertoletti, E.; Gherardi-Goldstein, E. (1990)
Implementação de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos.
CETESB, São Paulo.

Bekboelet, M.; Cecen, F.; Ozkosemen, G. (1996). *Wat. Sci Tech.* 34, 65-72.

Bertoletti, E.; Araújo, R.P.A.; Zagatto, P.A.; Gherardi-Goldstein, E.(1988). *Wat. Sci Tech.*, 20, 191-196.

Bertoletti, E.; Gherardi-Goldstein, E.; Nipper, M.G.(1989). *Revista DAE*, 49, 63-70.

Bertoletti, E. (1990). *Ciência e Cultura*, 42, 271-277.

Bervoets, L.; Baillieul, M.; Blust, R.; Verheyen, R. (1996). *Environ. Poll.*, 91, 333-341.

Beyruth, Z.; Sant'anna, C.L.; Azevedo, M.T.P.; Carvalho, M.C.; Pereira, H.A.S.L. (1992). Toxic Algae in Freshwaters of São Paulo State. In: Cordeiro-Marino, M.; Azevedo, M.T.P.; Sant'anna, C.L.; Yamaguishi-Tomita; Plastino, E.M. (eds.). *Algae and Environment: A General Approach*. Sociedade Brasileira de Ficologia, São Paulo.

Bitton, G.; Dutka, B.J. (1986). Introduction and Review of Microbial and Biochemical Toxicity Screening Procedures. In: Bitton, G.; Dutka, B.J. (eds). *Toxicity Testing Using Miroorganisms*. CRC Press, Bocca Raton.

Blum, D.J.W.; Speece, R.E. (1991). *Environ. Sci. Technol.* 24, 284-293.

Bringmann, G.; Kühn, R. (1959). *Gesundheits-Ingenieur*, 4, 115-120.

Bringmann, G.; Kühn, R. (1965). *Gesundheits-Ingenieur*, 7, 210-215.

Bringmann, G.; Kühn, R. (1980). *Wat. Res.*, 14, 231-241.

Bruchet A.; Rosseau, C.; Mallevalle (1990). *Journal AWWA*, 82, 66-74.

Calvo, A.M.; Terrón M.C.; Fidalgo, M.L.; Pelayo, J.M.; Galletti, G.C.; González, A.E. (1995). *Anal. Chim. Acta*, 309, 145-152.

Caux, P.-Y.; Ménard, L.; Kent, R.A. (1996). *Environ. Poll.*, 92, 219-225.

CETESB (1994). Relatório de Qualidade das Águas Interiores do Estado de São Paulo 1993, São Paulo.

CETESB (1996). Relatório Técnico - Comunidade Planctônica e Clorofila *a* do Complexo Billings: (out92/out93), DAHC, São Paulo.

CETESB (1997) comunicação pessoal, departamento jurídico.

Chen, C.-Y.; Lin, K.-C. (1997). *Environ. Toxicol. Chem.*, 16, 1337-1344.

Cheng-Fang, L; Hao, O.L.; Fu-Tien, J. (1994). *Wat. Sci Tech.*, 30, 97-106.

Claesson, A. (1975). *Vatten*, 4, 333-338.

- Clarkson, N.; Leftley, J.W.; Meldrum, D.T.; Watson, J.W. (1998).** *Wat. Res.*, 32, 1162-1168.
- Comber, M.H.; Smyth, D.V.; Thompson, R.S. (1995).** *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 55, 922-928.
- Corin, N.; Backlund, P.; Kulovaara, M. (1996).** *Chemosphere*, 33, 245-255.
- Dahlman, O.B.; Reimann, A.K.; Stromberg, L.M.; Moerck, R.E. (1995).** *Tappi J.*, 78, 99-109.
- DeWalle, F.B. ; Chian, S.K. (1974).** *Biotechnol. Bioeng.*, 16, 739-755.
- DIN 38409 - Teil 51 (1987).** Bestimmung des Biochemischen Sauerstoffbedarfs in *n* Tagen nach dem Verdünnungsprinzip (Verdünnungs-BSB). Berlin, Germany.
- DIN 38412 - Teil 9 (1989).** Bestimmung der Hemmwirkung von Wasserinhaltsstoffen auf Grünalgen (*Scenedesmus*-Zellvermehrungs-Hemmtest). Berlin, Germany.
- DIN 38408 - Teil 43 (1991).** Bestimmung des Chemischen Sauerstoffbedarfs von Abwasser. Berlin, Germany.
- DIN 38412 - Teil 16 (1991).** Bestimmung des Chlorophyll-a-Gehaltes von Oberflächenwasser. Berlin, Germany.
- DIN 38412 - Teil 33 (1991).** Bestimmung der nicht giftigen Wirkung von Abwasser gegenüber Grünalgen (*Scenedesmus*-Chlorophyll-Fluoreszenztest) über Verdünnungstufen. Berlin, Germany.

DIN 38412 - Teil 34 (1991). Bestimmung der Hemmwirkung von Abwasser auf die Lichtemission von *Photobacterium phosphoreum*. Leuchtakterien-Abwassertest mit konservierten Bakterien. Berlin, Germany.

Dorgerloh, M. (1997). *Umweltwiss. Schadst.-Forsch.*, 9, 222-224.

Duxbury, C.; Dixon, D.G.; Greenberg, M. (1997). *Environ. Toxicol. Chem.*, 16, 1739-1748.

EN (1993). Wachstumshemmtest mit den Süßwasseralgen *Scenedesmus subspicatus* und *Selenastrum capricornutum*. **28692 L9.**

Errecalde, O.; Seidl, M.; Campbell, P.G.C. (1998). *Wat. Res.*, 32, 419-429.

ETAD (1994). Ecological and Toxicological Association of Dyes and Organic Pigments Manufacturers. Annual Report.

Fargosová, A.; Drtil, M. (1996). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 56, 993-999.

Ferguson, E.A.; Hogstrand, C. (1998). *Environ. Toxicol. Chem.*, 17, 589-593.

Franta, J.R.; Wildener, P.A. (1997). *Wat. Sci Tech.*, 35, 129-136.

Frølund, B.; Palmgren, R.; Keiding, K.; Nielsen, P.H. (1996). *Wat. Res.*, 30, 1749-1758.

Furlong, J. (1995). *Sci. Total Environ.*, 171, 275-279.

Galletti, C.G.; Bocchini, P.; Martinez, A.T.; Pelayo, J.M. (1996). *Anal. Chim. Acta*, 335, 245-251.

- Garric, J.; Vindimian, E.; Ferard, J.F. (1993).** *Sci. Total Environ.*(sup.), 1085-1102.
- Giddings, J.M.; Biever, R.C.; Annunziato, M.F.; Hosmer, A.J. (1996).** *Environ. Toxicol. Chem.*, 15, 618-629.
- Göbbels, F.J.; Püttmann, W. (1997).** *Wat. Res.*, 31, 1609-1618.
- Gray, K.A.; McAuliffe, K.S. (1992).** *Journal AWWA*, 84, 95-107.
- Gunkel, G. (1994).** Bioindikation in aquatischen Ökosystemen. Gustav Fischer Verlag, Jena, Germany.
- Guzzella, L.; Mingazzini, M. (1994).** *Wat. Sci. Tech.*, 30, 113-124.
- Hamm, A. (1991).** Studie über Wirkungen und Qualitätsziele von Nährstoffen in Fließgewässern. Academia Verlag, Sankt Augustin, Germany.
- Hellawell, J.M. (1986).** Biological Indicators of Freshwater Pollution and Environmental Management. Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York, USA.
- Huang, X.D.; McConkey, B.J.; Babu, T.S.; Greenberg, B.M.(1997).** *Environ. Toxicol. Chem.*, 16, 1707-1715.
- Ingle, J.D.; Crouch, S.R.(1988).** Spectrochemical Analysis. Prentice-Hall, Englewood Cliffs.
- ISO 8692 (1989).** Water Quality-Algae Growth Inhibition Test with *Scenedesmus subspicatus* and *Selenastrum capricornutum*. International Standard Organization. Geneva, Switzerland.

- ISO 7887 (1994).** Examination and determination of colour. International Standard Organization. Geneva, Switzerland.
- Isomaa, B.; Lilius, H. (1995).** *Toxic. in Vitro*, 9, 821-825.
- Jardim, W.F.; Gimenez, S.M.N.; Canela, M.C.; Moraes, S.G. (1993).** *Chem. Spec. Bioavail.*, 5, 97-100.
- Jung, K.; Bitton, G. (1997).** *Environ. Toxicol. Chem.*, 16 , 2264-2267.
- Kahru, A.; Kurvet, M.; Kuelm, I. (1996).** *Wat. Sci. Tech.*, 33, 139-146.
- Kamiya, M; Kameyama, K. (1998).** *Chemosphere*, 36, 2337-2344.
- Keating, K.; Caffrey, P.B.; Dagbusan, B.C. (1996).** *Environ. Toxicol. Chem.*, 15, 348-352.
- Kettern, J. (1990).** *Gewässerschutz, Wasser, Abwasser*, 113, 129-138.
- Klefer, E.; Sigg, L.; Schosseller, P. (1997).** *Environ. Sci. Technol.*, 31, 759-764.
- Kirk, J.T.O. (1994).** *Light and Phothosynthesis in Aquatic Ecosystems*. Cambridge University Press, Cambridge, USA.
- Kohl, J-G.; Nicklisch, A. (1988).** *Ökophysiologie der Algen: Wachstum und Ressourcennutzung*. Gustav Fischer Verlag, Berlin, Germany.
- Kopinke, F.-D.; Poerschermann, J.; Stottmeister, U. (1995).** *Environ. Sci. Technol.*, 29, 941-950.

Kotzick, R.; Niesser, R. (1996). *Fresenius J. Anal. Chem.*, 354, 72-76.

Kühn, R.; Pattard, M. (1990). *Wat. Res.*, 24, 31-38.

Lawler, A.J.; Leonard, J.N.; Fergen, R.E.; Boothe, P.N. (1995). *Wat. Environ. Technol.*, 1, 34-37.

Lewis, M. (1995). *Environ. Pollut.*, 87, 319-336.

Link, J.; Gilbert, E.; Eberle, S.H. (1989). *Vom Wasser*, 72, 349-370.

Llanten, C.E.C.; Greppin, H. (1994). *Arch. Sci.*, 46, 249-258.

MacCarthy, P.; Suffet, I.H. (1989). In: Aquatic Humic Substances and their Influence on the Fate and Treatment of Pollutants. Advances in Chemistry Series. American Chemical Society, Washington, USA.

Madsen, L. (1984). *Ecol. Bull.*, 36, 165-170.

Maloney, T.E.; Miller, W.E. (1975). Algae Assays: Development and Application, Water Quality Parameters, ASTM STP 573, 344-355.

Matsché, N.; Stumwöhrer, K. (1997). *Abwasser Special*, 137, 25-30.

Mayer, P.; Cuhel, R.; Nyholm, N. (1997). *Wat. Res.*, 31, 2525-2531.

Miikki, V.; Senesi, N.; Hanninen, K. (1997). *Chemosphere*, 34, 1639-1651.

- Mudrack, K.; Kunst, S. (1991).** *Biologie der Abwasserreinigung*. Gustav Fischer Verlag. Stuttgart, Germany.
- Nirmalakhandan, N.; Sun, B.; Arulgnanendran, V.J.; Mohsin, M.; Wang, X.H.; Prakash, J.; Hall, N. (1994).** *Wat. Sci. Tech.*, 30, 87-96.
- Novaha, M; Vogel, W.R.; Gaugitsch, H. (1995).** *Environ. Int.*, 21, 33-37.
- Nyholm, N; Källqvist, T. (1989).** *Environ. Toxicol. Chem.*, 8, 689-703.
- Oanh, N.T.K.; Bengtsson, B.E. (1995).** *Environ. Poll.*, 90, 391-399.
- OECD (1984).** Guideline for Testing of Chemicals: Algae Growth Inhibition Test - Doc. n° 201. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France.
- Pawlik-Skowronska, B.; Kacyorowska, R.; Skowronski, T. (1997).** *Environ. Pollut.*, 97, 65-69.
- Pedersen, F.; Petersen, G.I. (1996).** *Wat. Sci Tech.*, 33, 109-119.
- Peter, S.; Sierdorfer, C.; Kaltwasser, H.; Geiger, M. (1995).** *Environ. Toxicol. Wat. Quality: An Intern. Journal*, 10, 179-184.
- Peterson, H.G.; Nyholm, N. (1993).** *Wat. Poll. Res. J. Canada*, 38, 129-153.
- Peterson, H.G.; Nyholm, N.; Nelson, M.; Powell, R.; Huang, P. M.; Scroggings, R. (1996).** *Wat. Sci Tech.*, 33, 155-161.
- Peterson, S.M; Stauber, J.L. (1996).** *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 56, 750-757.

Roubidoux, P.Y.; Lopez-Gastey, J.; Choucri, A.; Sunahara, G.I. (1998). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 39, 31-40.

Sáenz, M.E.; Alberdi, J.L.; Di Marzio, W.D.; Tortorelli, M.C. (1997). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 58, 922-928.

Saiz-Jimenez, C. (1994). *Environ. Sci. Technol.*, 28, 1773-1780.

SAS/STAT (1989). User's Guide Version 6, Cary, NC: SAS Institut Inc.

Schwoerbel, J. (1993). Einführung in die Limnologie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Germany.

Soerensen, M.; Tanner, U.; Sagawe, G.; Frimmel, F.H. (1996). *Acta hydrochim. hydrobiol.*, 24, 132-136.

Stevenson, F.J. (1994). Humus Chemistry: Genesis, Composition, Reactions. John Wiley & Sons, Inc., New York, USA.

Stubblefield, W.A.; Brinkman, S.F.; Davies, P.H.; Garrison, T.D. (1997). *Environ. Toxicol. Chem.*, 16, 2082-2089.

Sugiura, K. (1996). *Wat. Res.*, 30, 1801-1812.

Sweet, L.I.; Travers, D.F.; Meier, P.G. (1997). *Environ. Toxicol. Chem.*, 16, 2187-2189.

Tingzong, G.; Delaune, R.D.; Patrick, W.H.Jr. (1997). *Environ. Int.*, 23, 305-316.

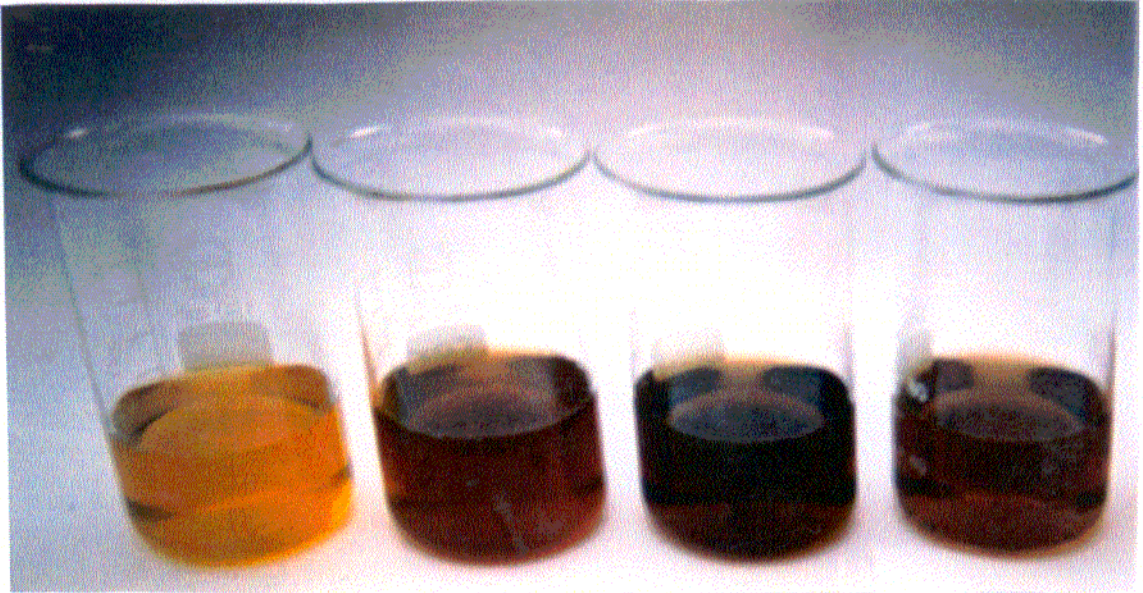
- Tundisi, J.G.; Matsumura-Tundisi, T. (1992).** Eutrophication of Lakes and Reservoirs: A Comparative Analysis, Case Studies, Perspectives. In: Cordeiro-Marino, M.; Azevedo, M.T.P.; Sant'anna, C.L.; Yamaguishi-Tomita; Plastino, E.M. (eds.). *Algae and Environment: A General Approach*. Sociedade Brasileira de Ficologia, São Paulo.
- Vanegas, C.; Espina, S.; Botello, A.V.; Villanueva, S. (1997).** *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 58, 87-92.
- Wundram, M.; Selmar, D.; Bahadir, M. (1996).** *Chemosphere*, 32, 1623-1630.
- Zagatto, P.A.; Bertoletti, E.; Gherardi-Goldstein, E. (1988).** *Ambiente*, 2, 39-42.
- Zagatto, P.A.; Gherardi-Goldstein, E.; Bertoletti, E.; Lombardi, C.C.; Martins, M.H.R.B.; Ramos, M.L.L.C. (1987).** *Wat. Sci. Tech.*, 19, 95-106.
- Zargorc-Koncan, J. (1996).** *Wat. Sci. Tech.*, 6, 181-187.

ANEXO I

Composições dos meios de cultura ISO 8692, SCE e U.S. EPA para o ensaio com a alga *Scenedesmus subspicatus*.

sais nutrientes	Meio ISO (mg.L⁻¹)	Meio SCE (mg.L⁻¹)	Meio U.S.EPA (mg.L⁻¹)
CaCl ₂ . 2 H ₂ O	18,0	36,0	4,41
MgCl ₂ . 6 H ₂ O	12,0	-	12,2
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	15,0	75,0	14,7
NaNO ₃	-	496,0	25,5
NH ₄ Cl	15,0	-	-
Na ₂ CO ₃	-	58,0	-
NaHCO ₃	50,0	-	15,0
K ₂ HPO ₄ . 3H ₂ O	-	40,0	1,04
KH ₂ PO ₄	1,6	-	-
citrato de ferro amoniacal	-	3,0	-
ácido cítrico	-	3,0	-
micronutrientes (µg.L⁻¹)			
CuCl ₂ . 2 H ₂ O	0,01	-	0,012
CuSO ₄ . 5 H ₂ O	-	3,16	-
H ₃ BO ₃	185	114	185
MnCl ₂ . 4H ₂ O	415	72,4	416
Na ₂ EDTA . 2 H ₂ O	100	10	300
ZnCl ₂	3,0	-	3,27
ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	-	8,8	-
CoCl ₂ . 6 H ₂ O	1,5	-	1,43
Co(NO ₃) ₂ . 6 H ₂ O	-	1,96	
Na ₂ MoO ₄ . 2 H ₂ O	7,0	15,6	7,26
relação N/P (massa)	11	-	23

ANEXO II



1

2

3

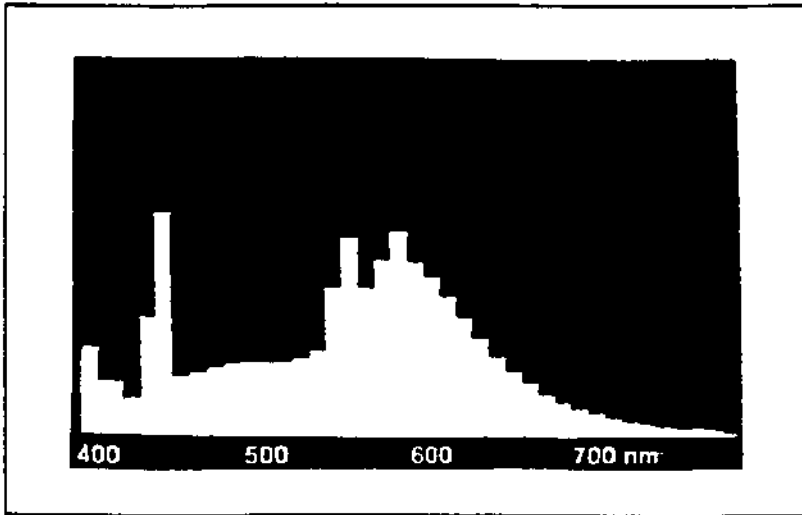
4

- | | |
|-------------------|---|
| AMOSTRA 1: | efluente da produção de pectina |
| AMOSTRA 2: | efluente após etapa de desnitrificação |
| AMOSTRA 3: | efluente após tratamento anaeróbico |
| AMOSTRA 4: | efluente final |

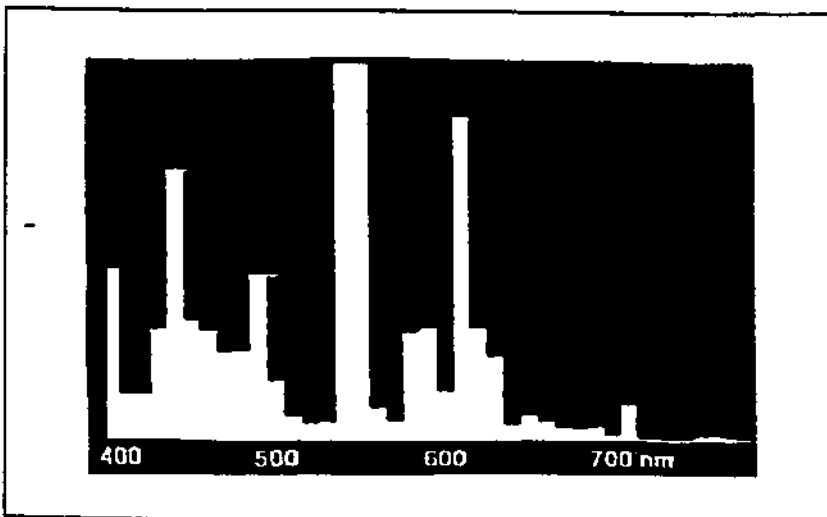
ANEXO III

Distribuição Espectral da Luz Branca Universal e da Luz Diurna

1- Luz branca universal

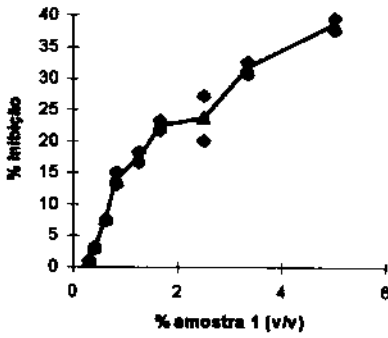


2- Luz diurna

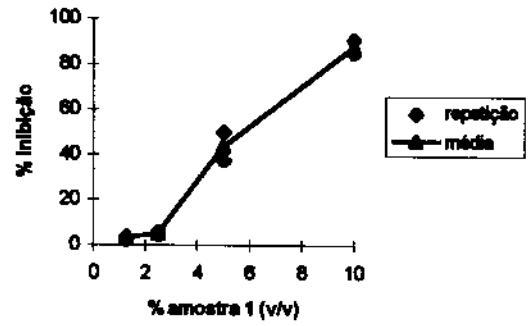


ANEXO IV

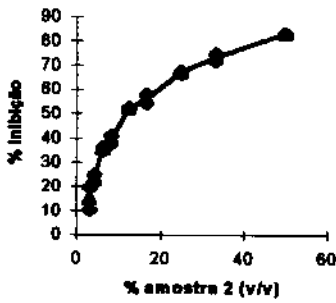
Curvas concentração-resposta dos efluentes da indústria de pectina:
a) com a alga *S. subspicatus*; b) com a bactéria *V. fischeri*



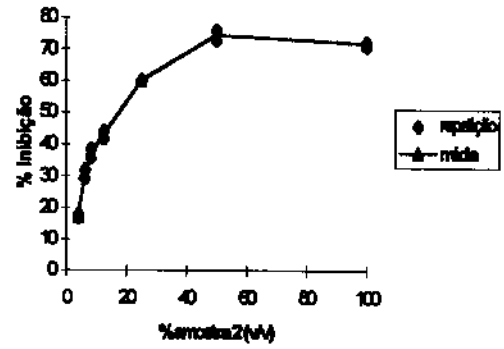
a)



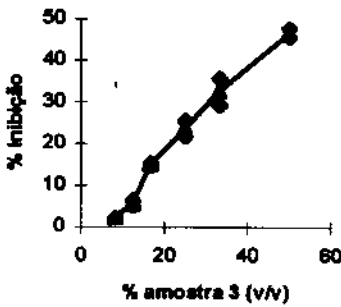
b)



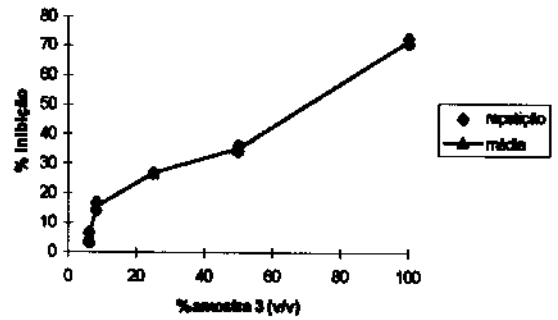
a)



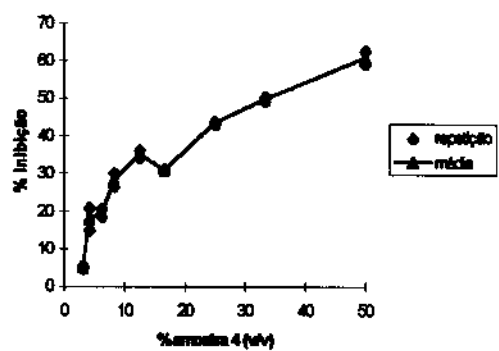
b)



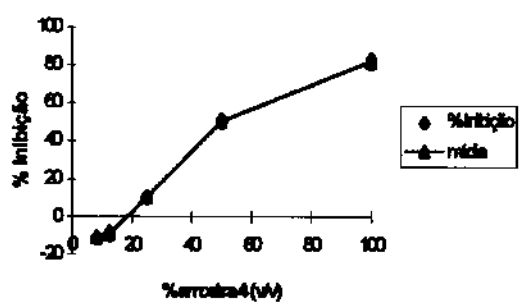
a)



b)



a)

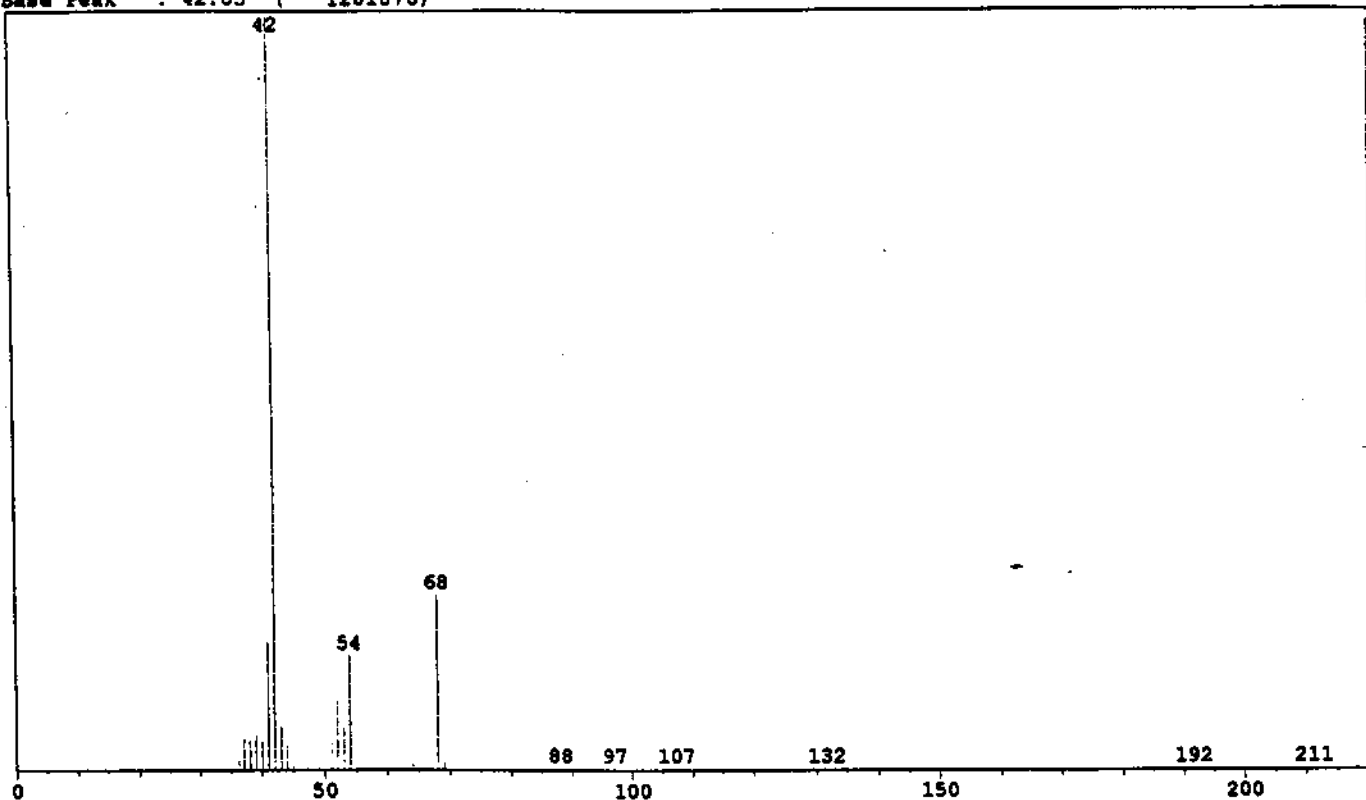


b)

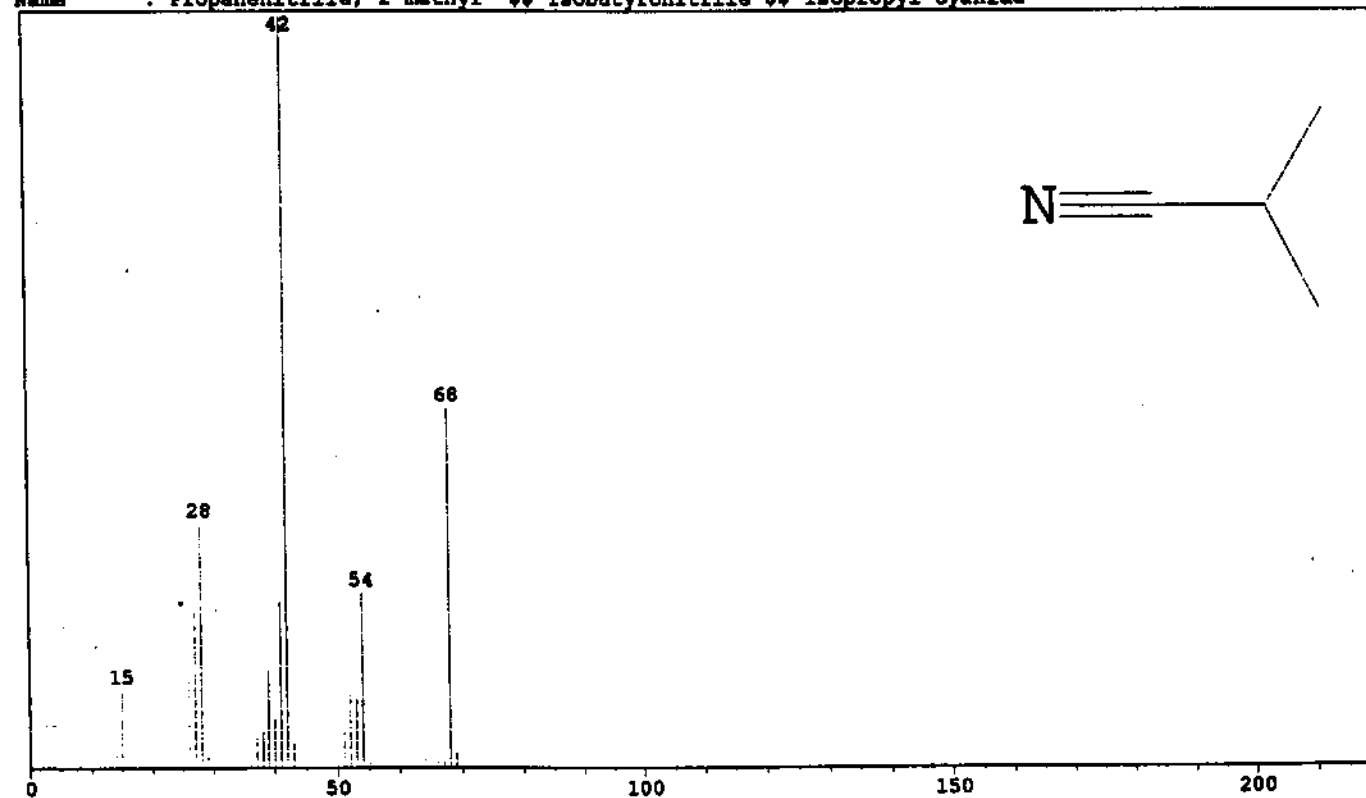
ANEXO V

Espectros de massa dos principais compostos encontrados nas amostras do sistema de tratamento de efluentes da indústria de pectina

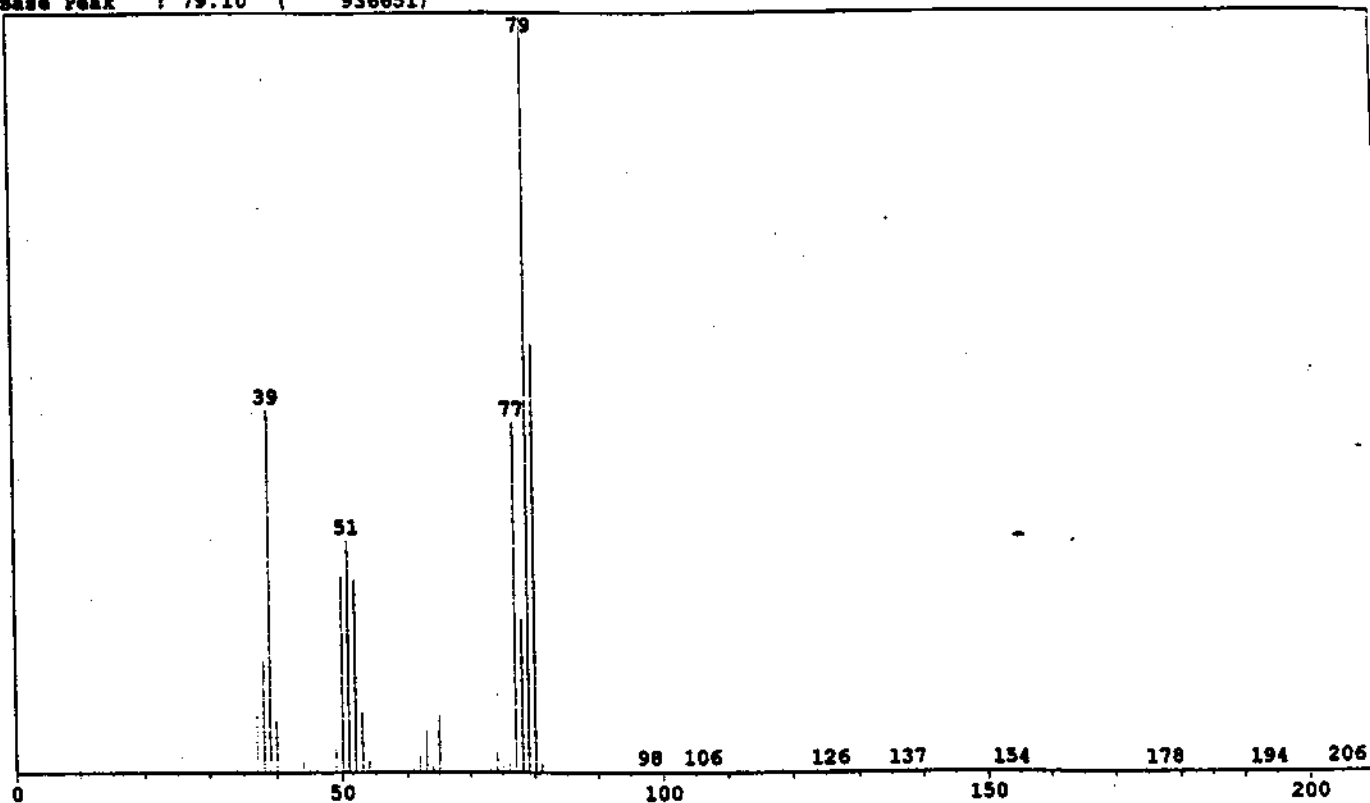
Scan # : 125 B.G. Scan # : 133
Mass Peak # : 24 Ret. Time : 6.067 B.G. Time : 6.200
Base Peak : 42.05 (1281876)



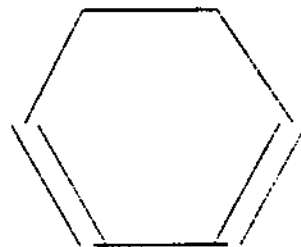
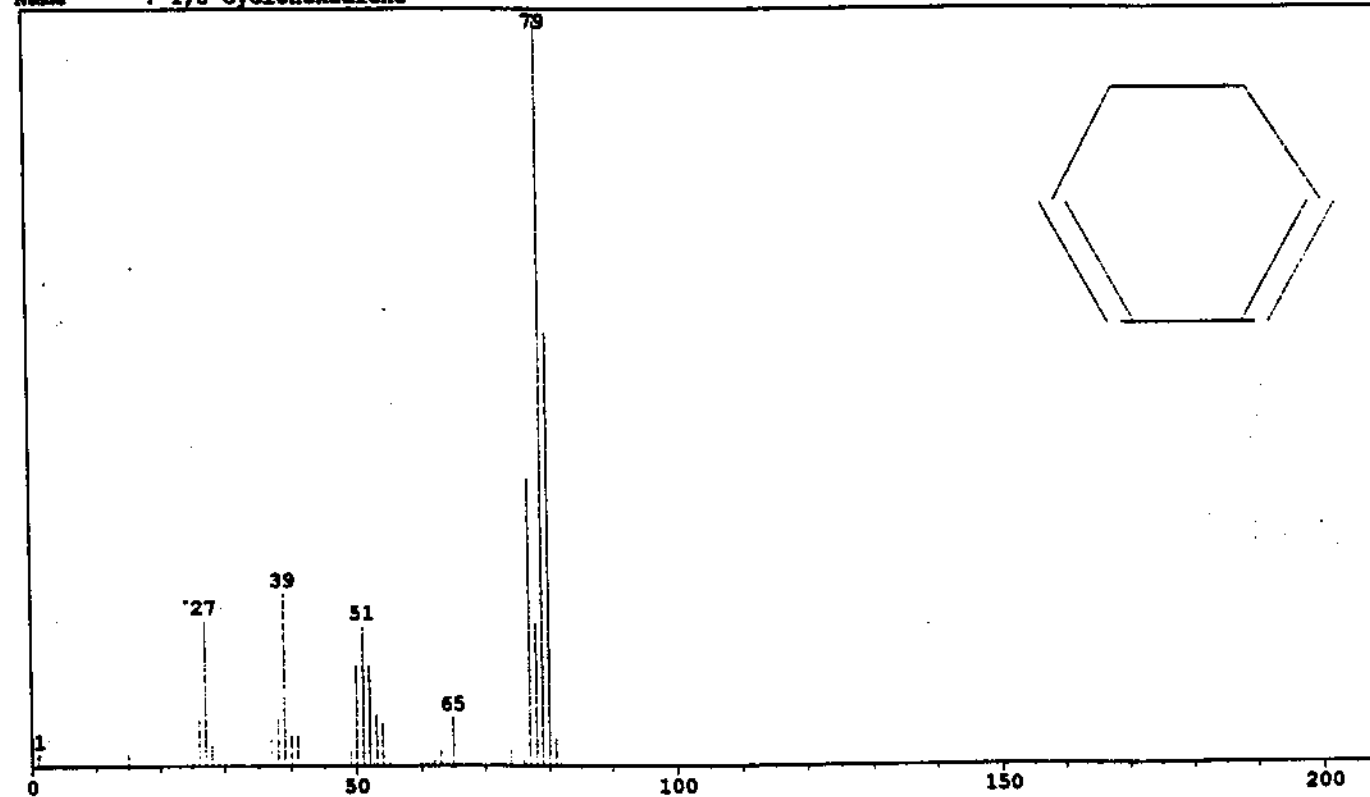
Data2 NIST62.LIB
Entry : 201 CAS : 78-82-0 Mol.Wgt. : 69
Mol.Form. : C₄H₇N
Name : Propanenitrile, 2-methyl- \$\$ Isobutyronitrile \$\$ Isopropyl cyanide



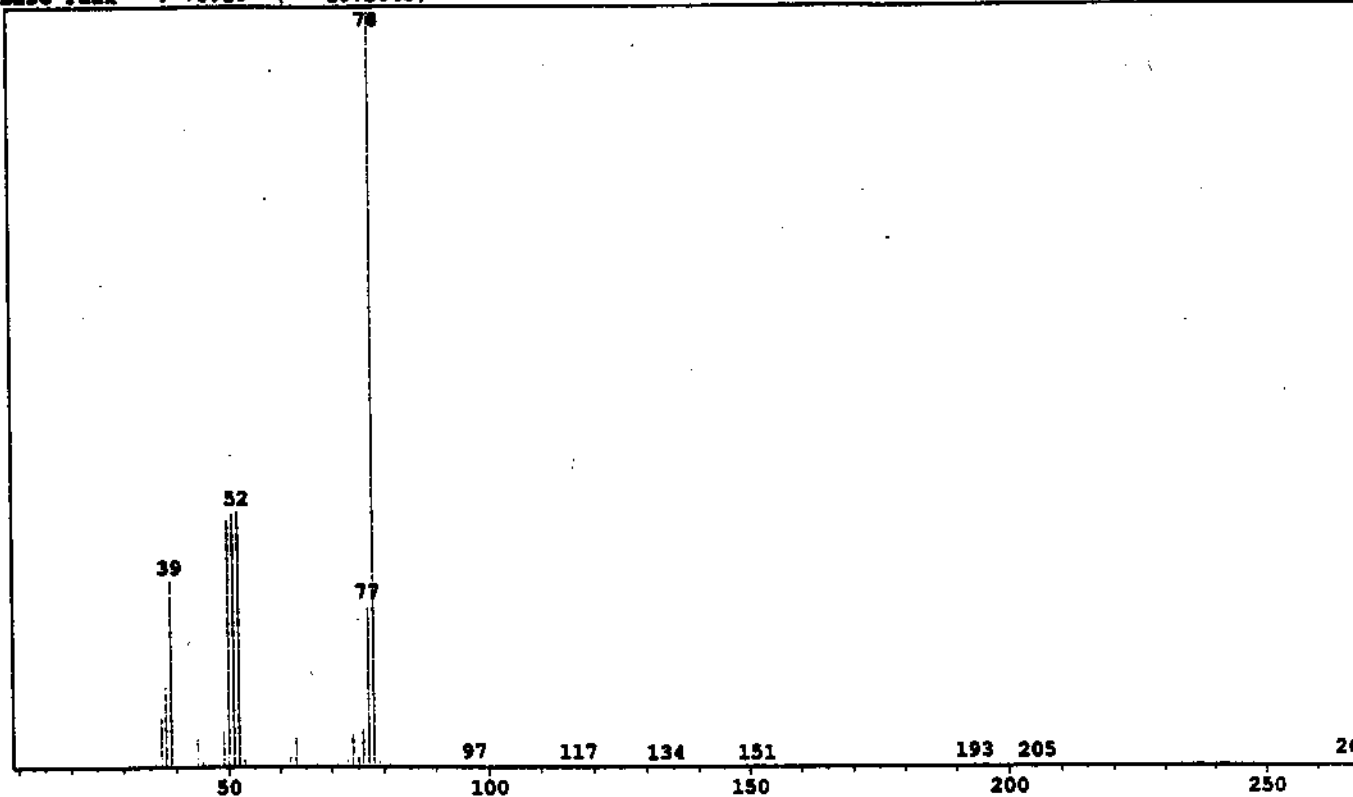
Detal PROBE9.D04
Scan # : 140 B.G. Scan # : 149
Mass Peak # : 32 Ret. Time : 6.317 B.G. Time : 6.467
Base Peak : 79.10 (936651)



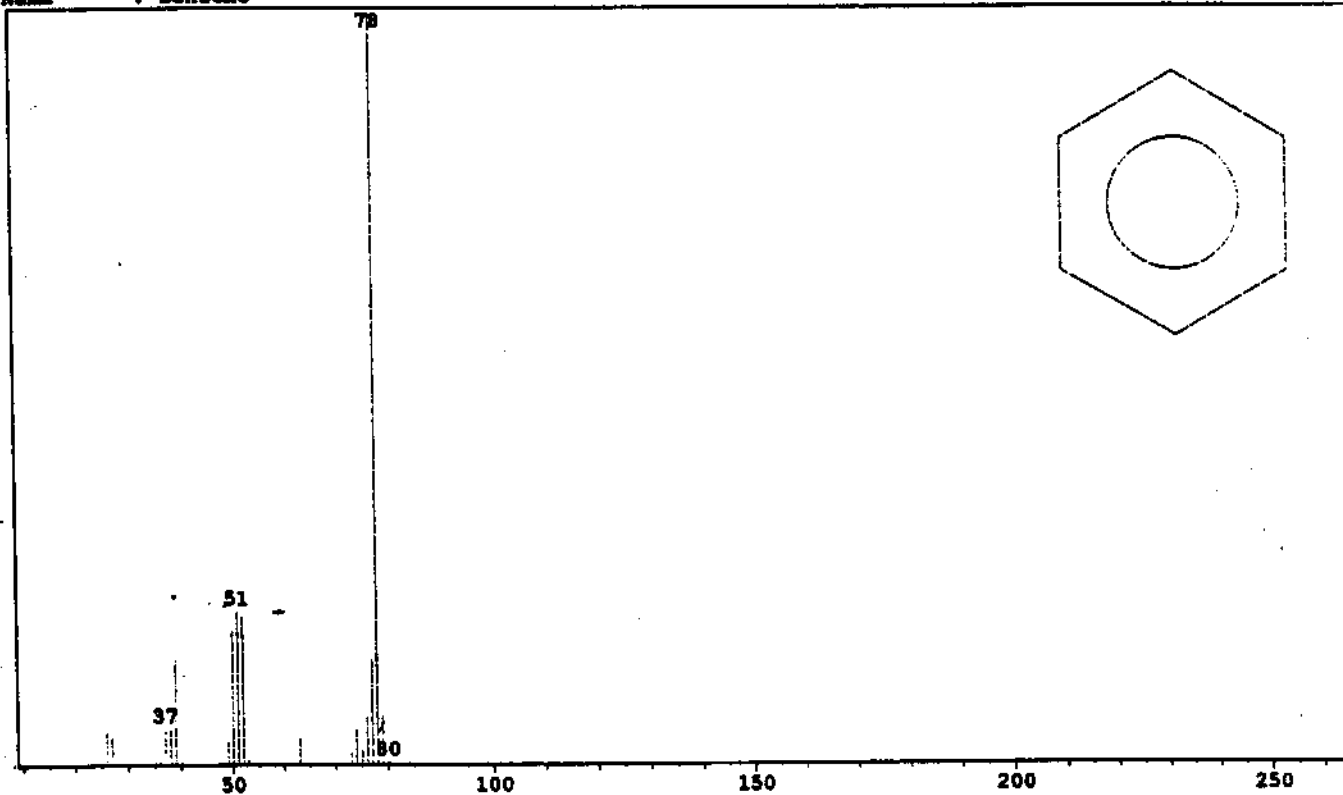
Data2 NIST12.LIB
Entry : 414 CAS : 592-57-4 Mol.Wgt. : 80
Mol.Form. : C₆H₈
Name : 1,3-Cyclohexadiene



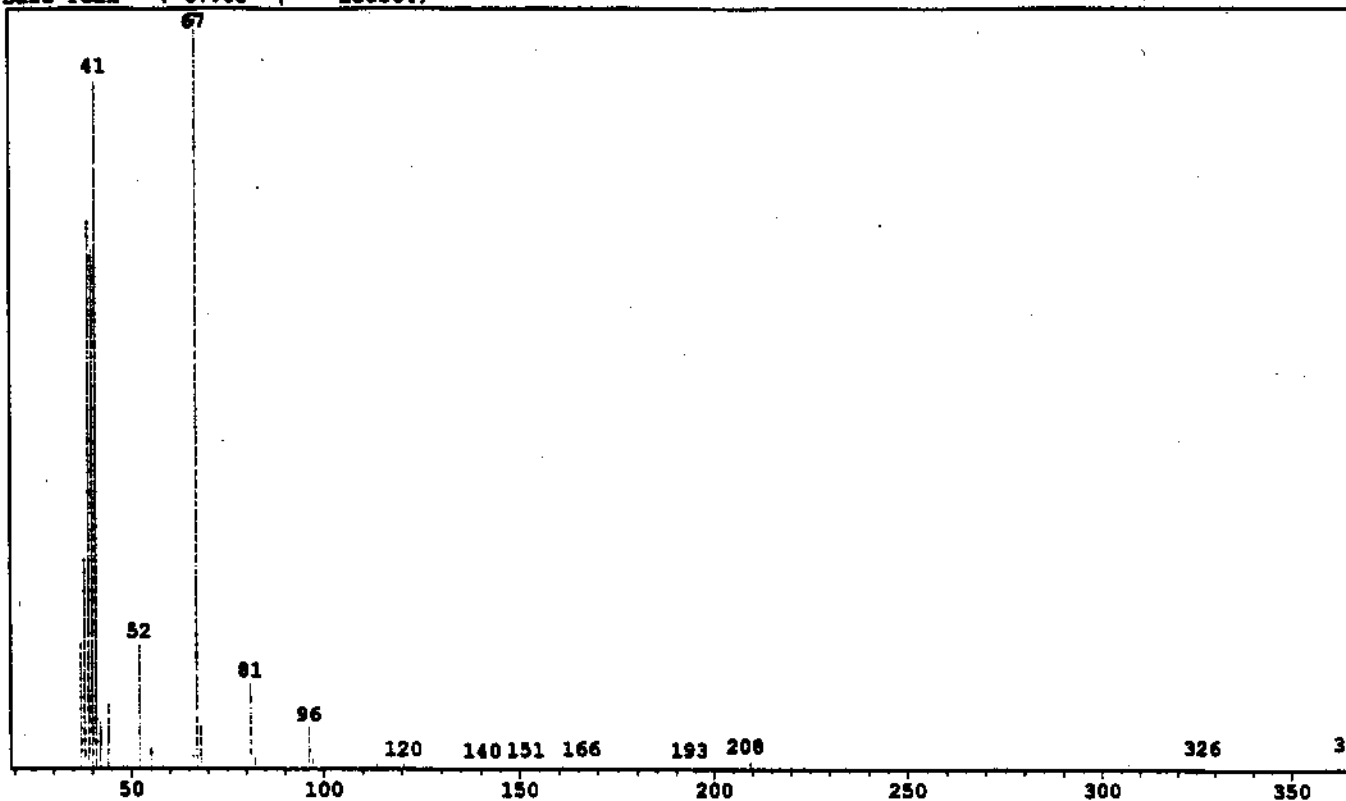
Miss Peak # : 34 Ret. Time : 6.917 S.G. Time : 7.000
Base Peak : 78.10 (1072043)



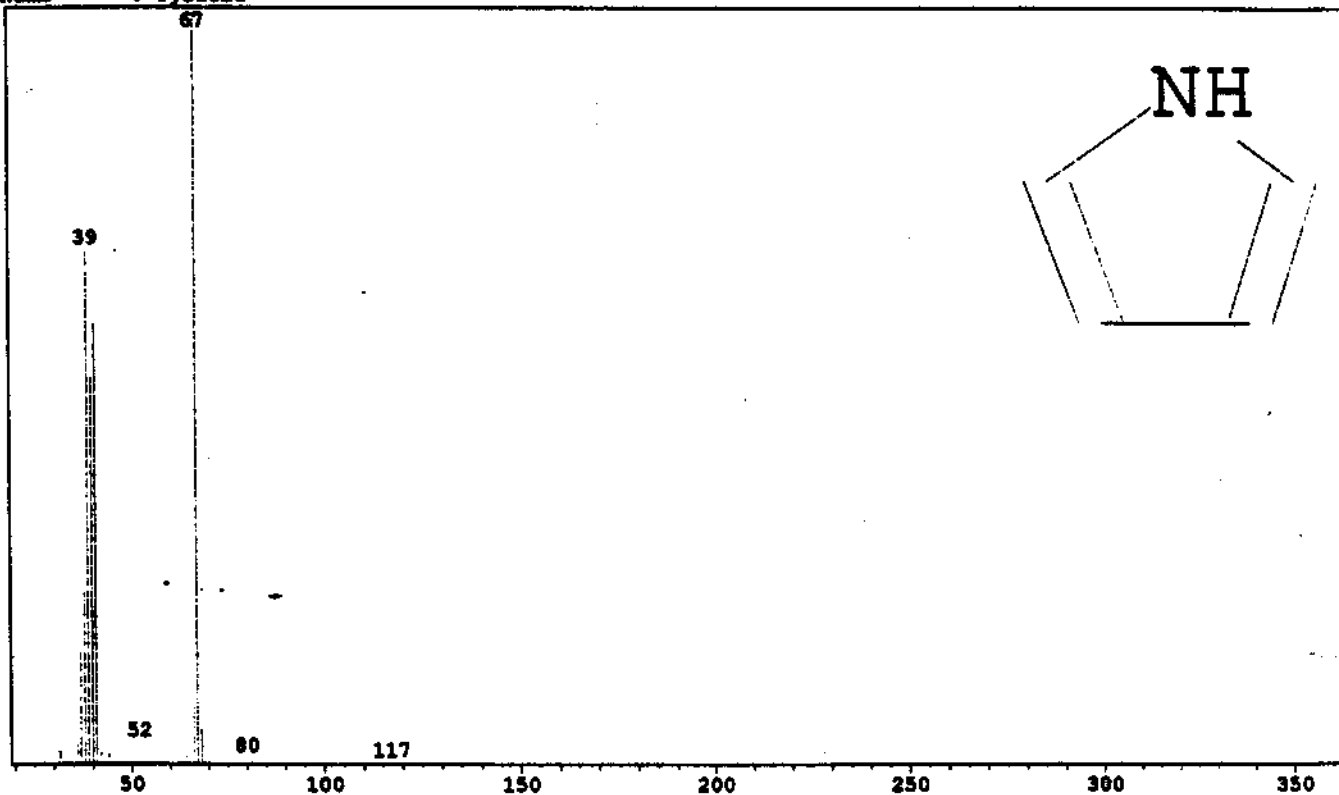
Data2 MIST12.LIB
Entry : 392 CAS : 71-43-2 Mol.Wgt. : 78
Mol.Form. : C₆H₆
Name : Benzene



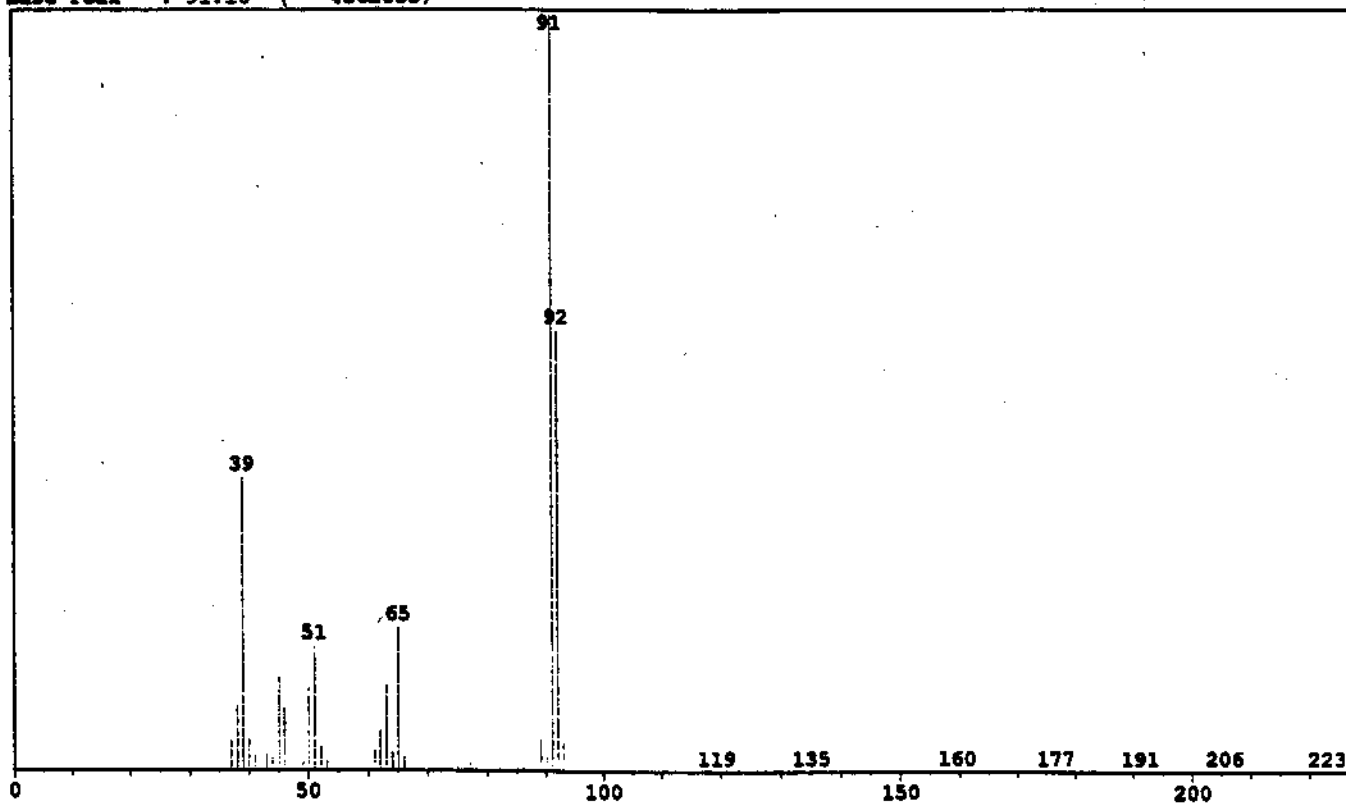
Scan: 1 : 363 S.G. Scan: 1 : 363
Mass Peak: 1 : 45 Ret. Time: 9.683 S.G. Time: 9.783
Base Peak: 1 : 67.05 (285364)



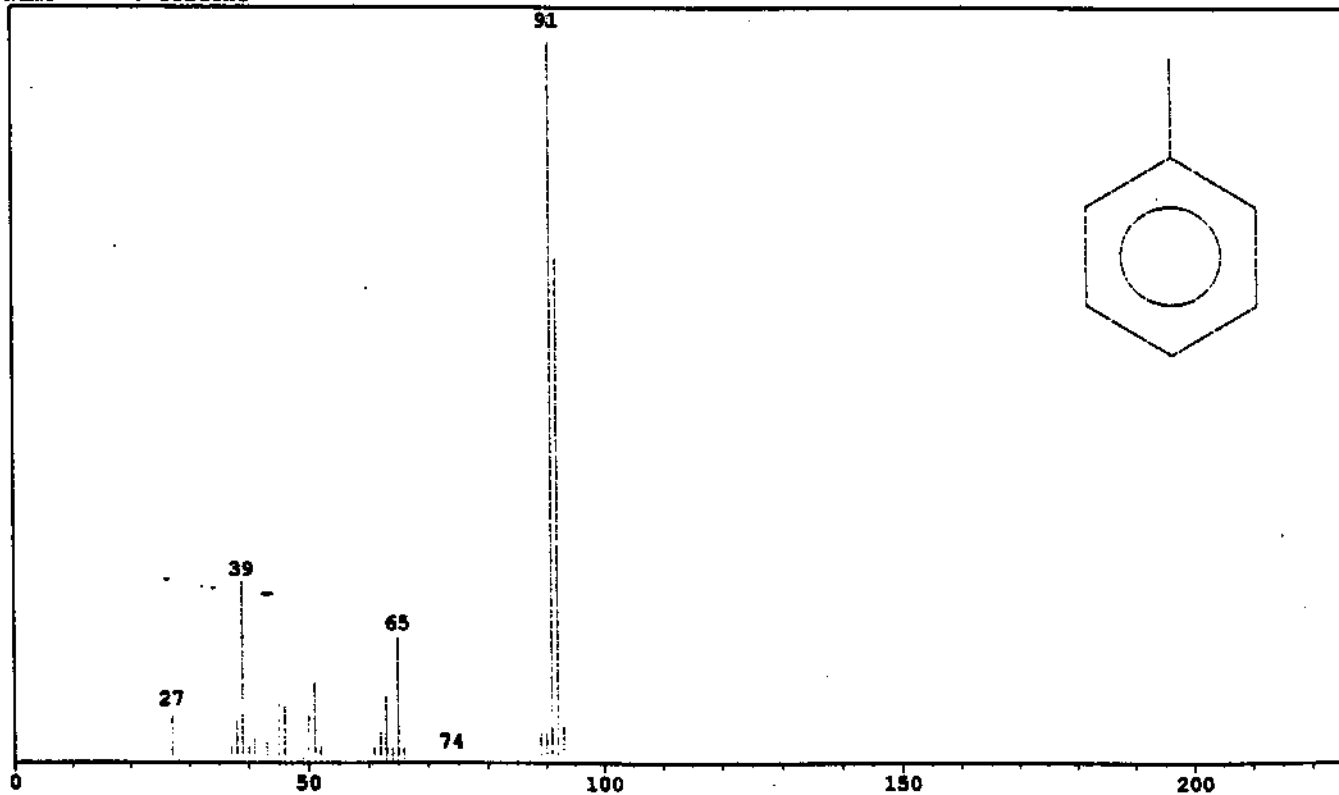
Data2 NIST12.LIB
Entry : 154 CAS : 109-97-7 Mol.Wgt. : 67
Mol.Form. : C₄H₅N
Name : Pyrrole



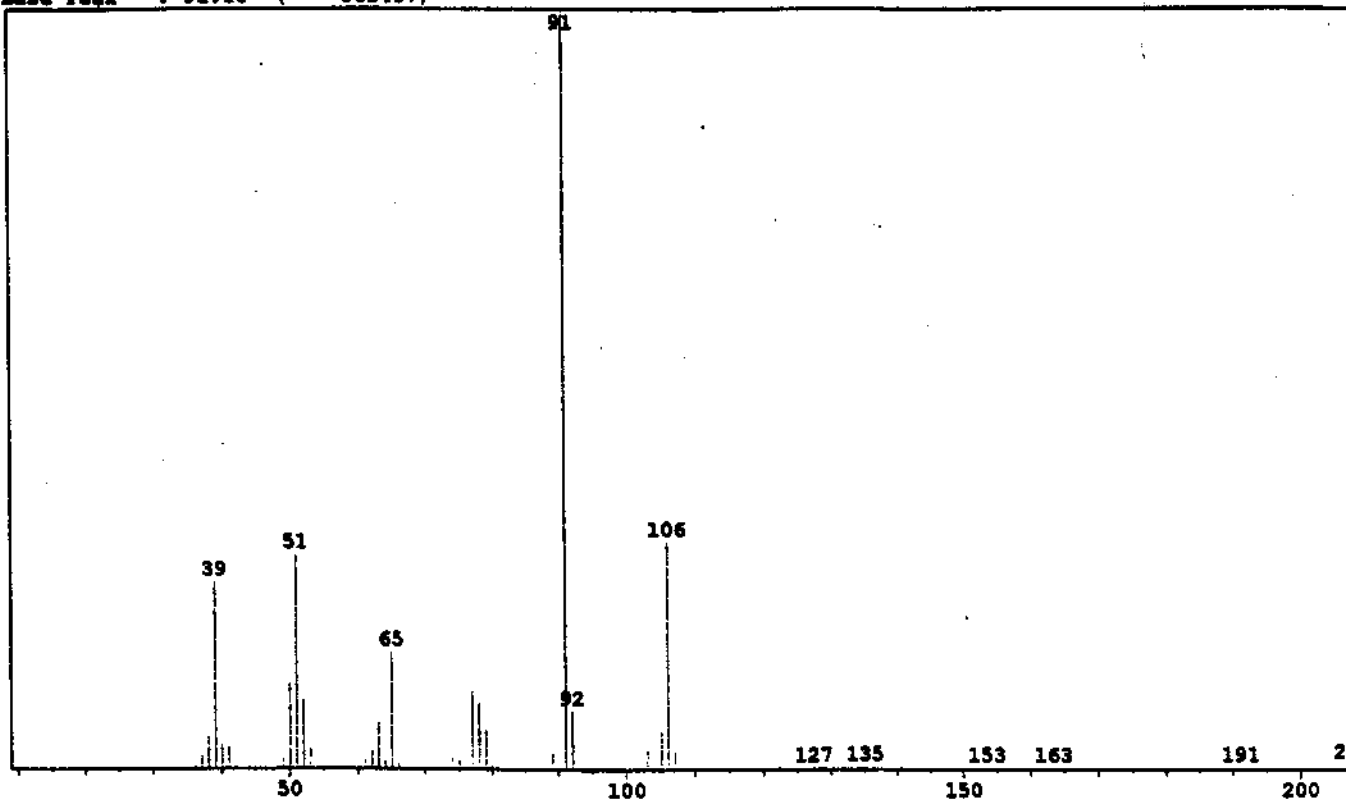
Scan # : 393 E.G. Scan # : 393
Mass Peak # : 46 Ret. Time : 10.400 E.G. Time : 10.633
Base Peak : 91.10 (4362855)



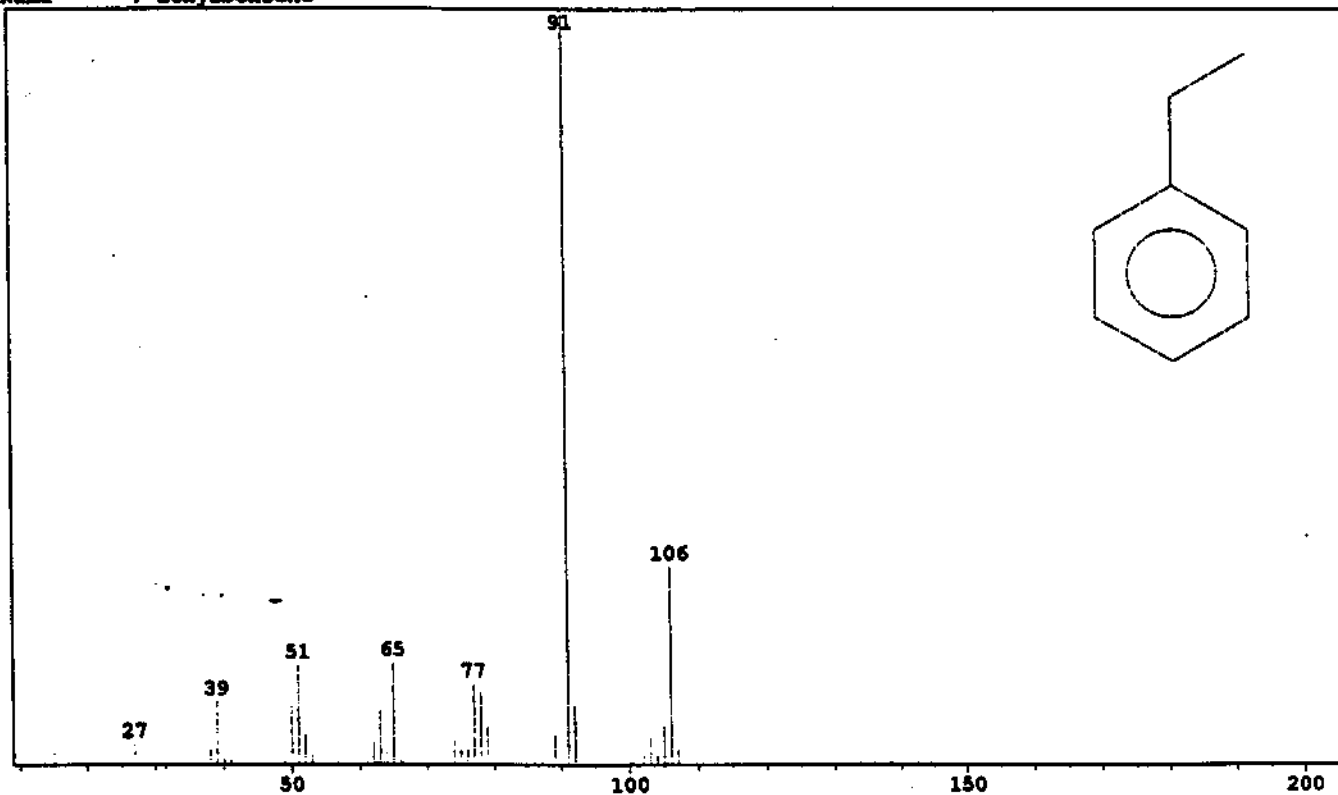
Data2 NIST12.LIB
Entry : 796 CAS : 108-88-3 Mol.Wgt. : 92
Mol.Form. : C₇H₈
Name : Toluene



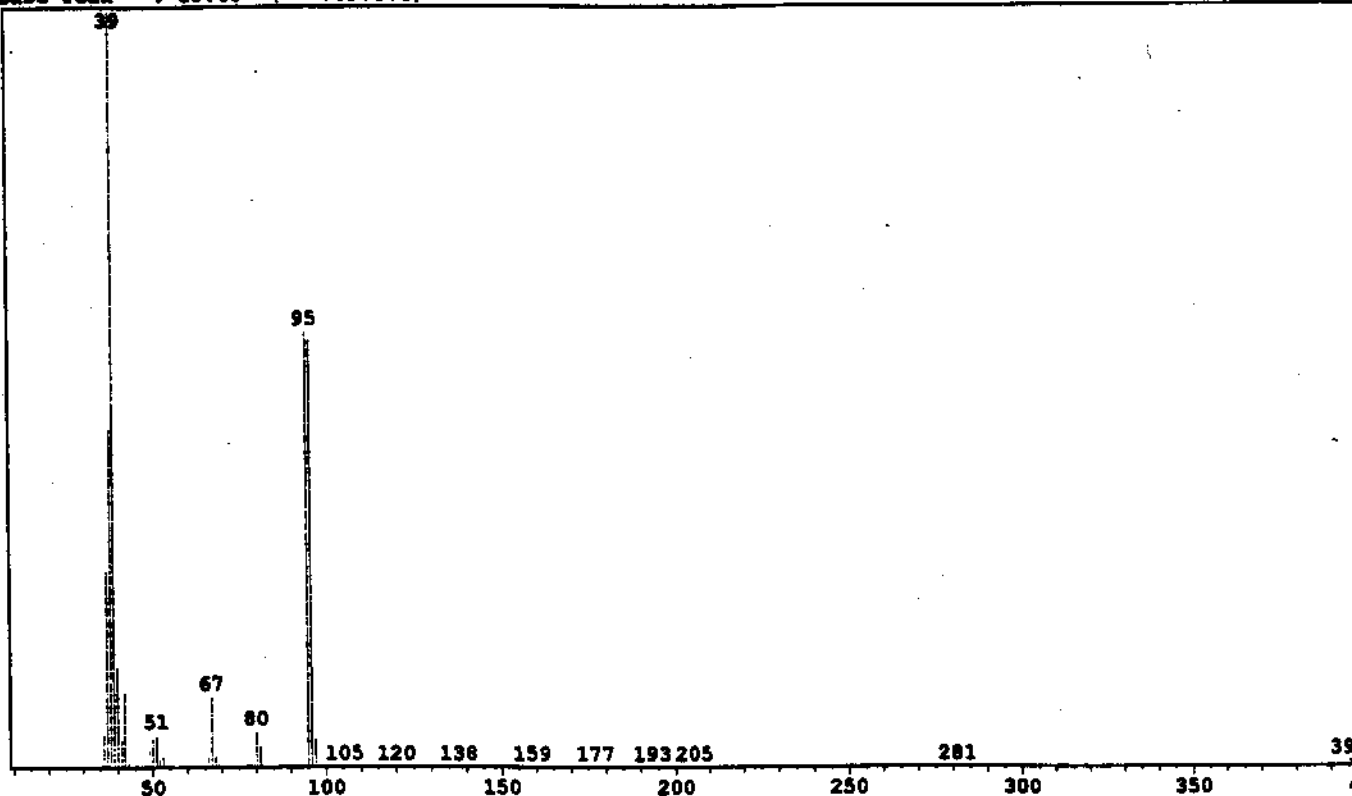
Scan # : 671 B.G. Scan # : 695
Mass Peak # : 54 Ret. Time : 14.000 B.G. Time : 14.067
Base Peak : 91.10 (865407)



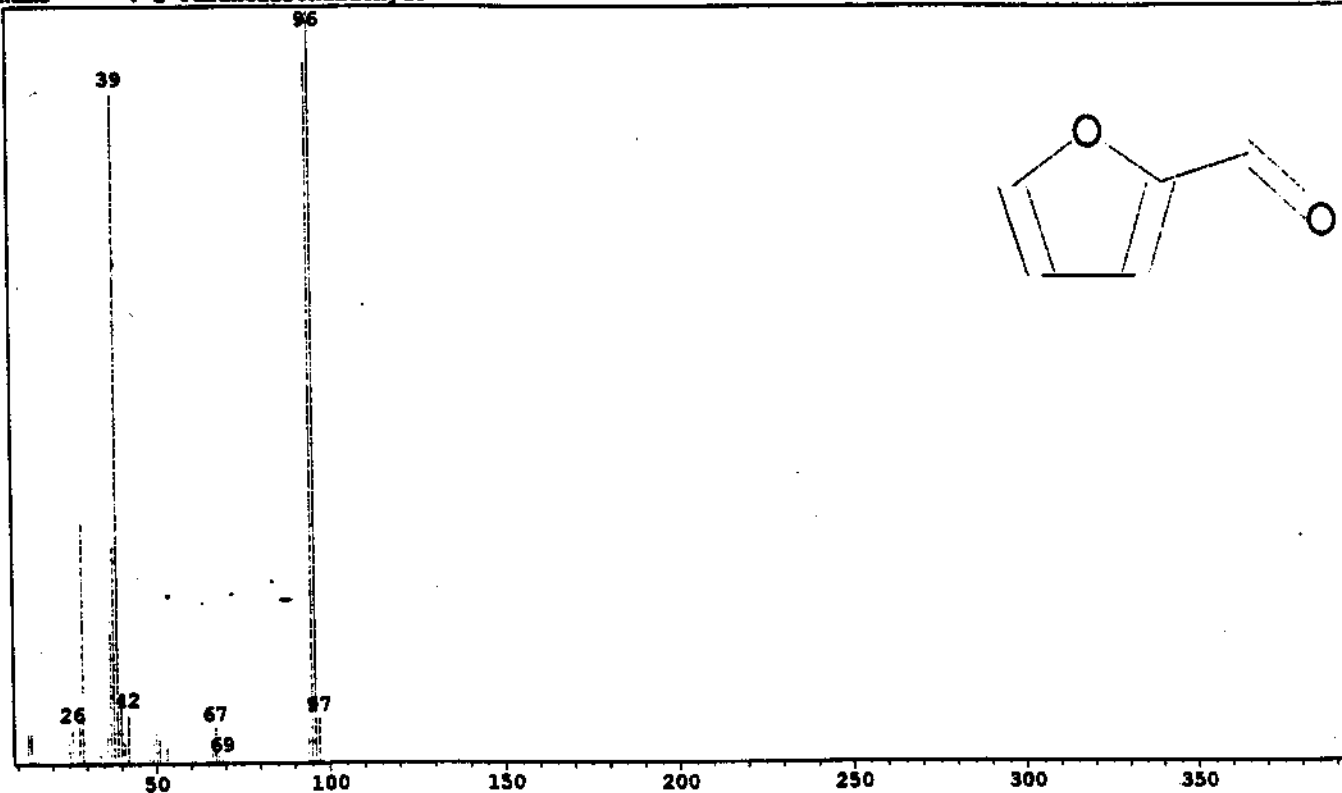
Data2 NIST12.LIB
Entry : 1459 CAS : 100-41-4 Mol.Wgt. : 106
Mol.Form. : C₈H₁₀
Name : Ethylbenzene



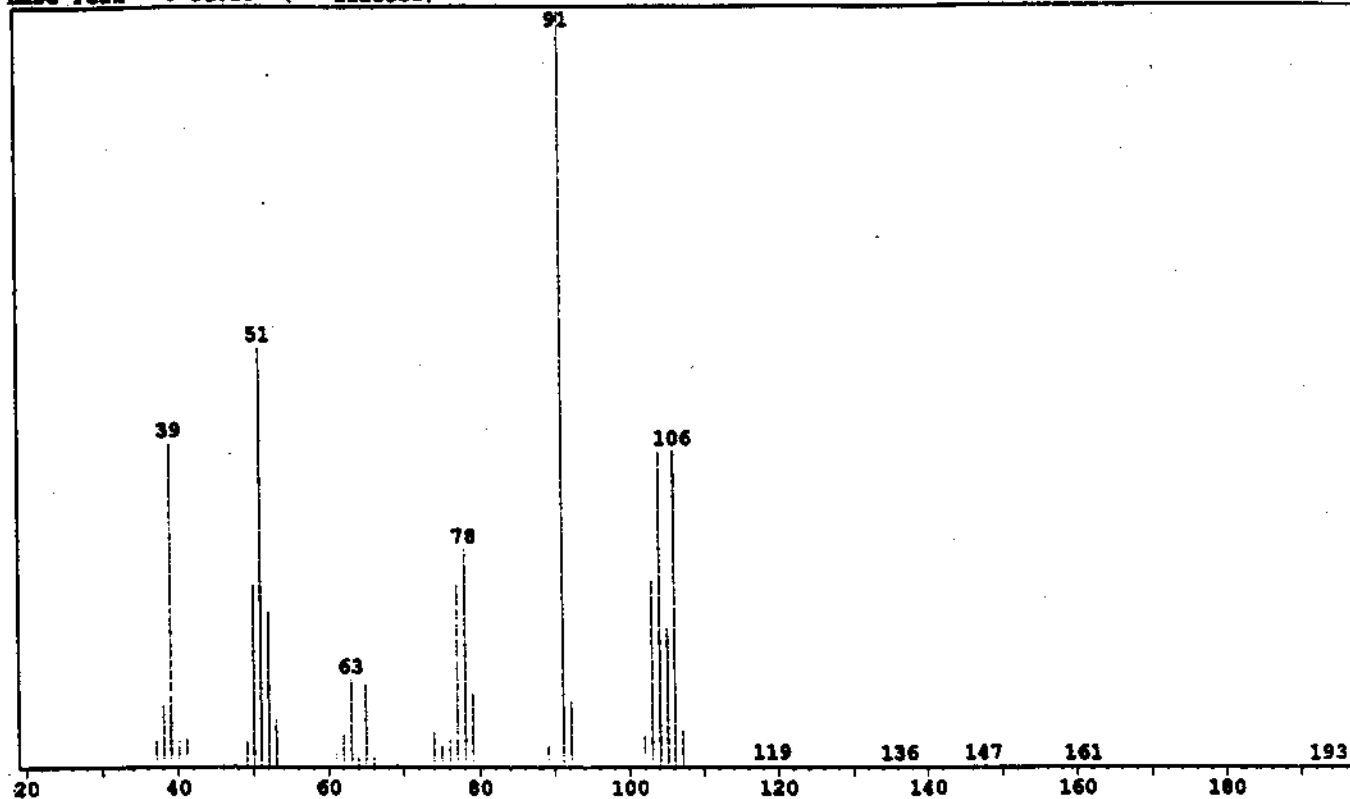
Scan 9 : 549 B.G. Scan 9 : 548
Mass Peak : 41 Ret. Time : 13.317 B.G. Time : 13.408
Base Peak : 39.05 (7097676)



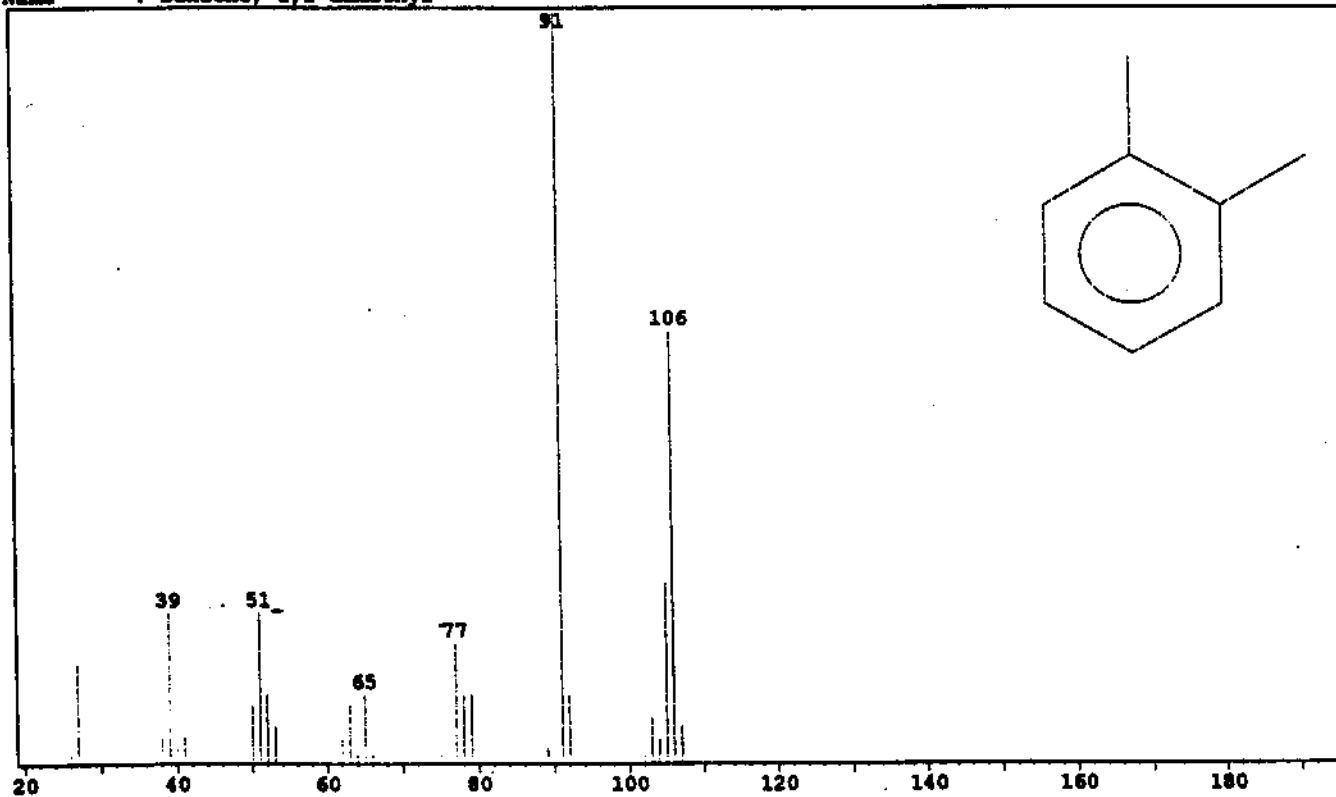
Data2 NIST12.LIB
Entry : 867 CAS : 98-01-1 Mol.Wgt. : 96
Mol.Form. : C₅H₄O₂
Name : 2-Furancarboxaldehyde



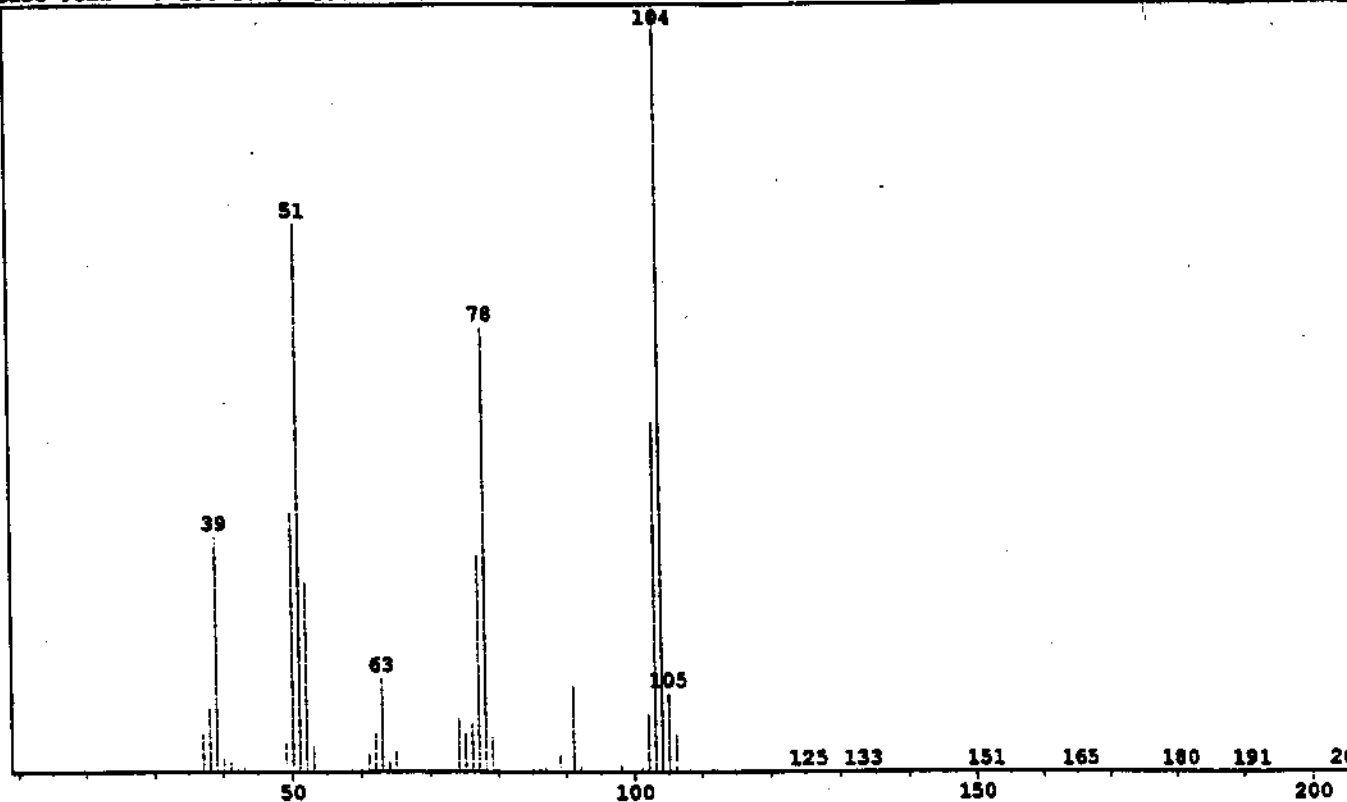
Scan # : 1000
Mass Peak # : 58 Ret. Time : 15.300 B.G. Time : 15.303
Base Peak : 91.10 (1125538)



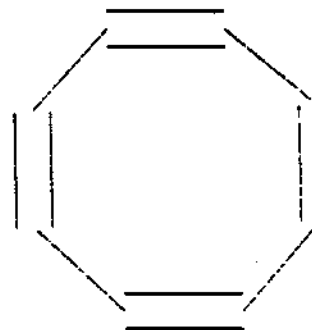
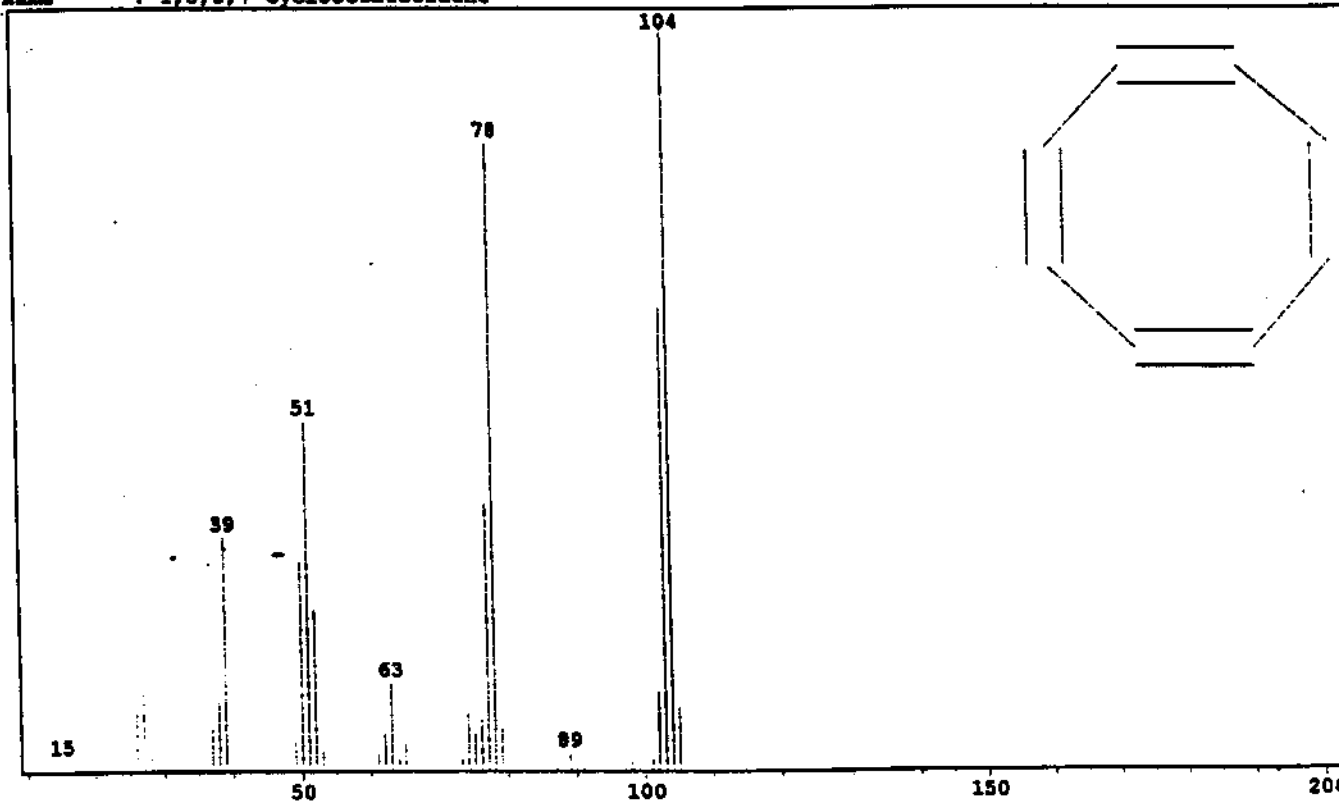
Data2 NIST12.LIB
Entry : 1470 CAS : 95-47-6 Mol.Wgt. : 106
Mol.Form. : C₈H₁₀
Name : Benzene, 1,2-dimethyl-



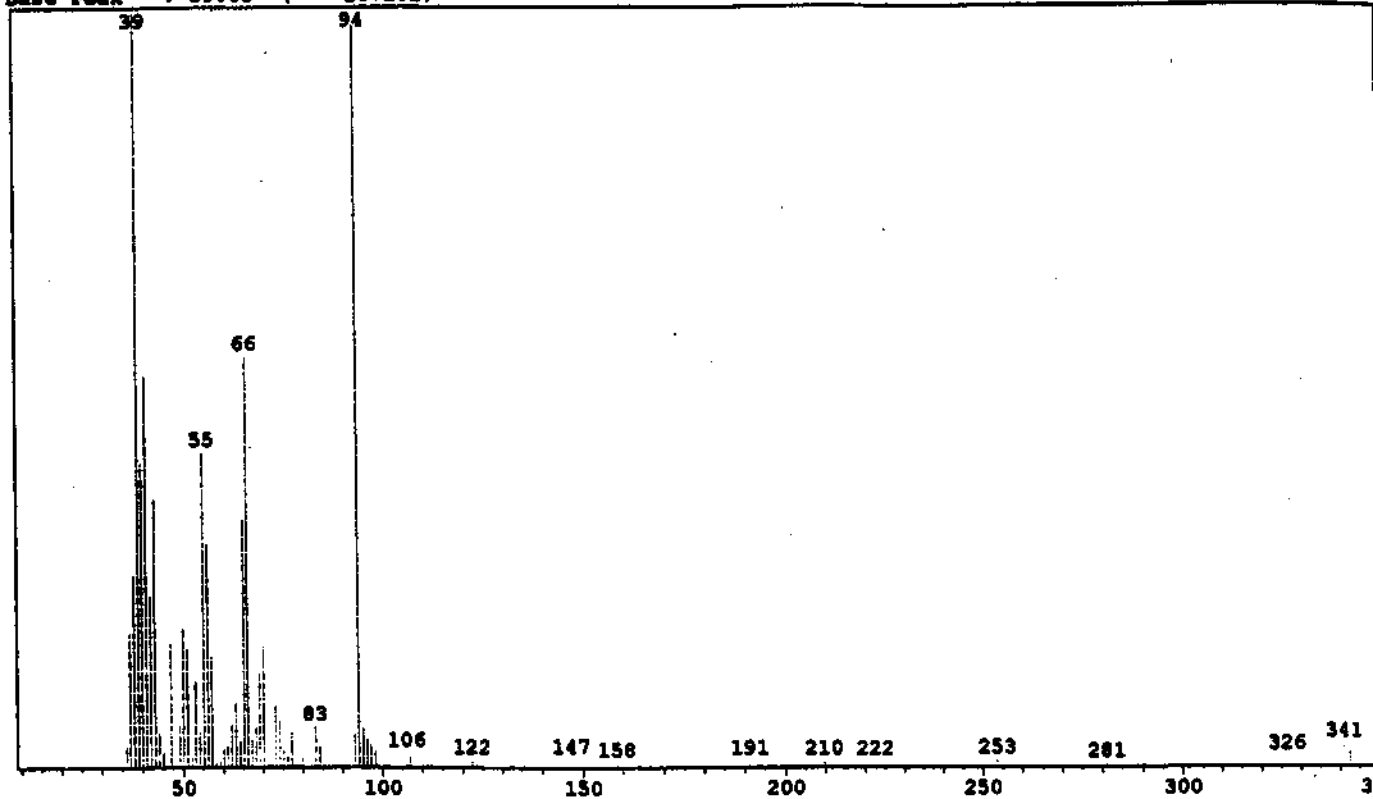
Data1 PROBE8.D04
Scan # : 678 B.G. Scan # : 684
Mass Peak # : 67 Ret. Time : 15.283 B.G. Time : 15.383
Base Peak : 104.10 (10693460)



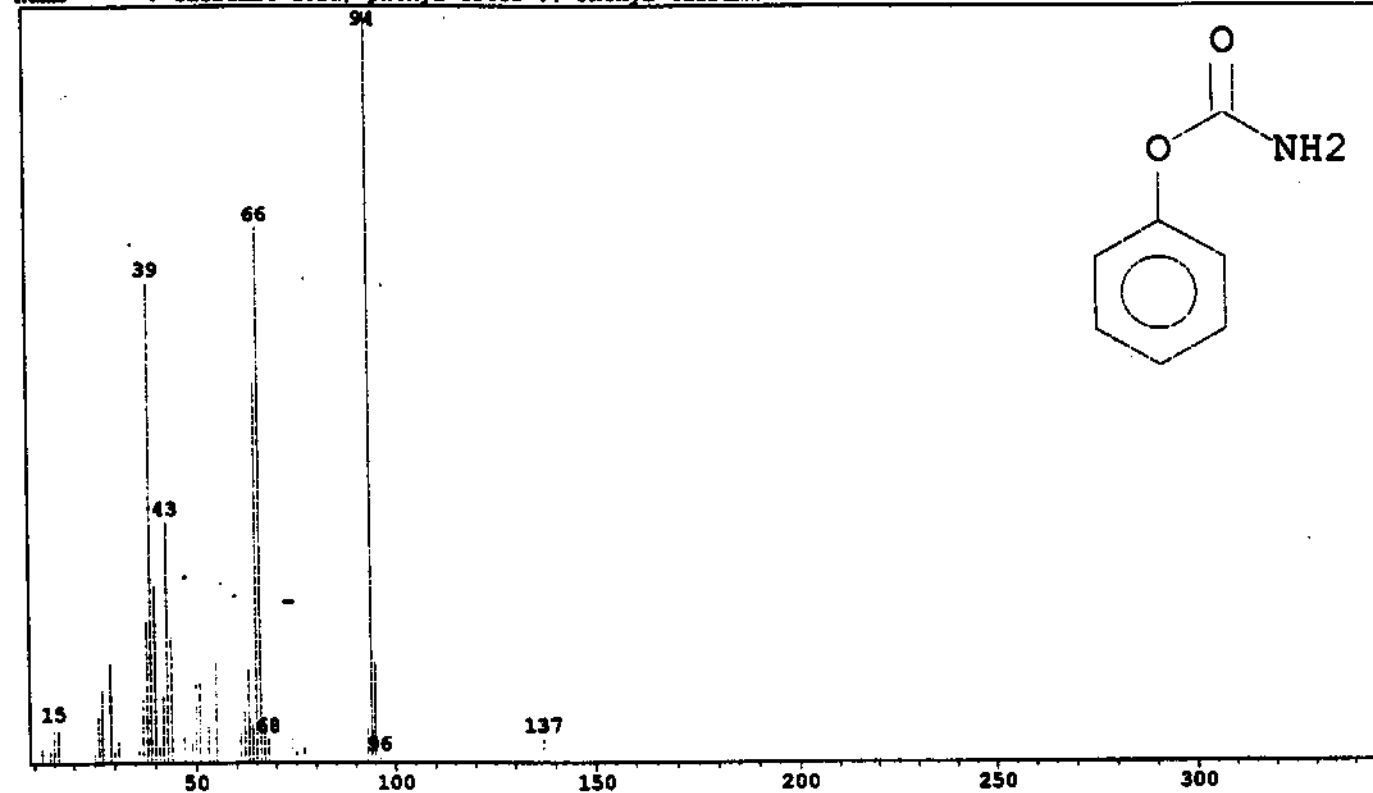
Data2 NIST12.LIB
Entry : 1412 CAS : 629-20-9 Mol.Wgt. : 104
Mol.Form. : C₈H₈
Name : 1,3,5,7-Cyclooctatetraene



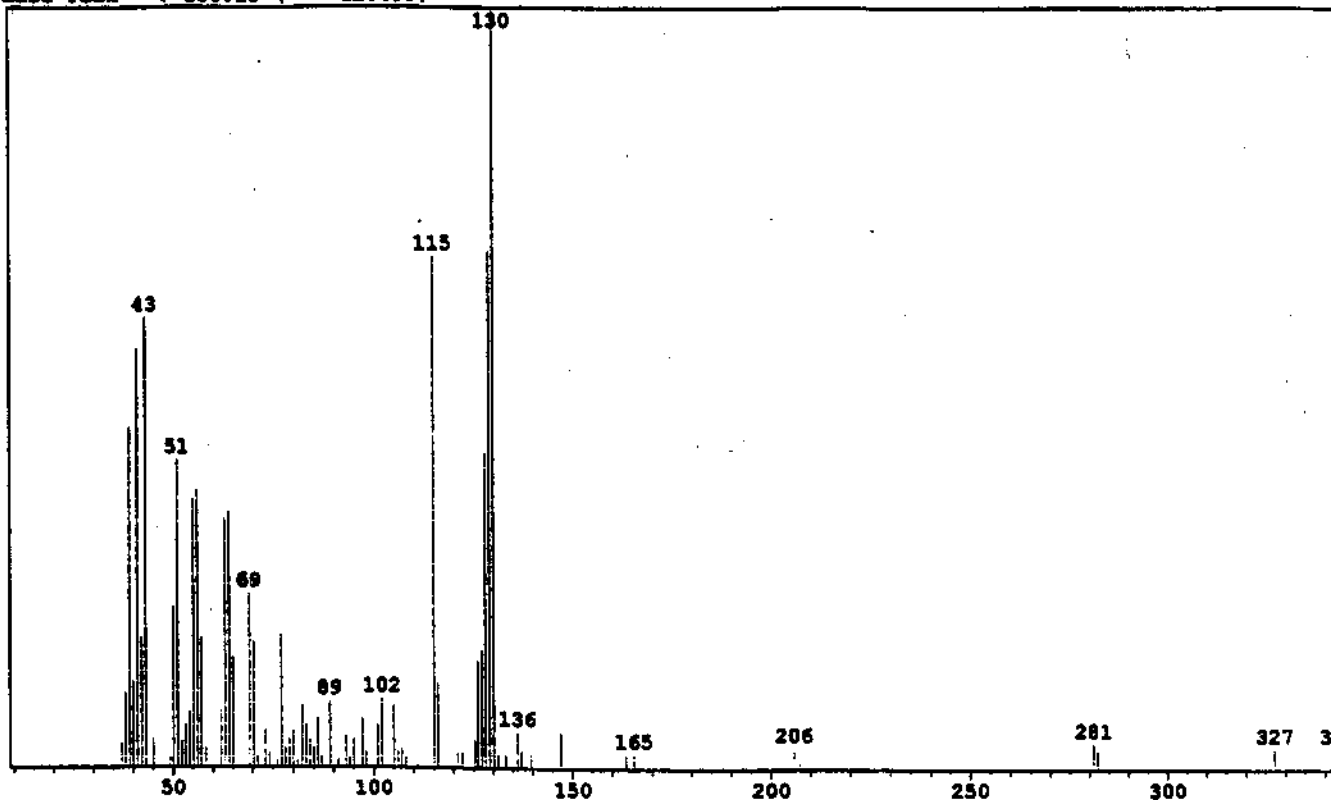
Mass # : 84 Ret. Time : 18.250 B.G. Time : 18.350
Mass Peak # : 84 Ret. Time : 18.250 B.G. Time : 18.350
Base Peak : 39.05 (287101)



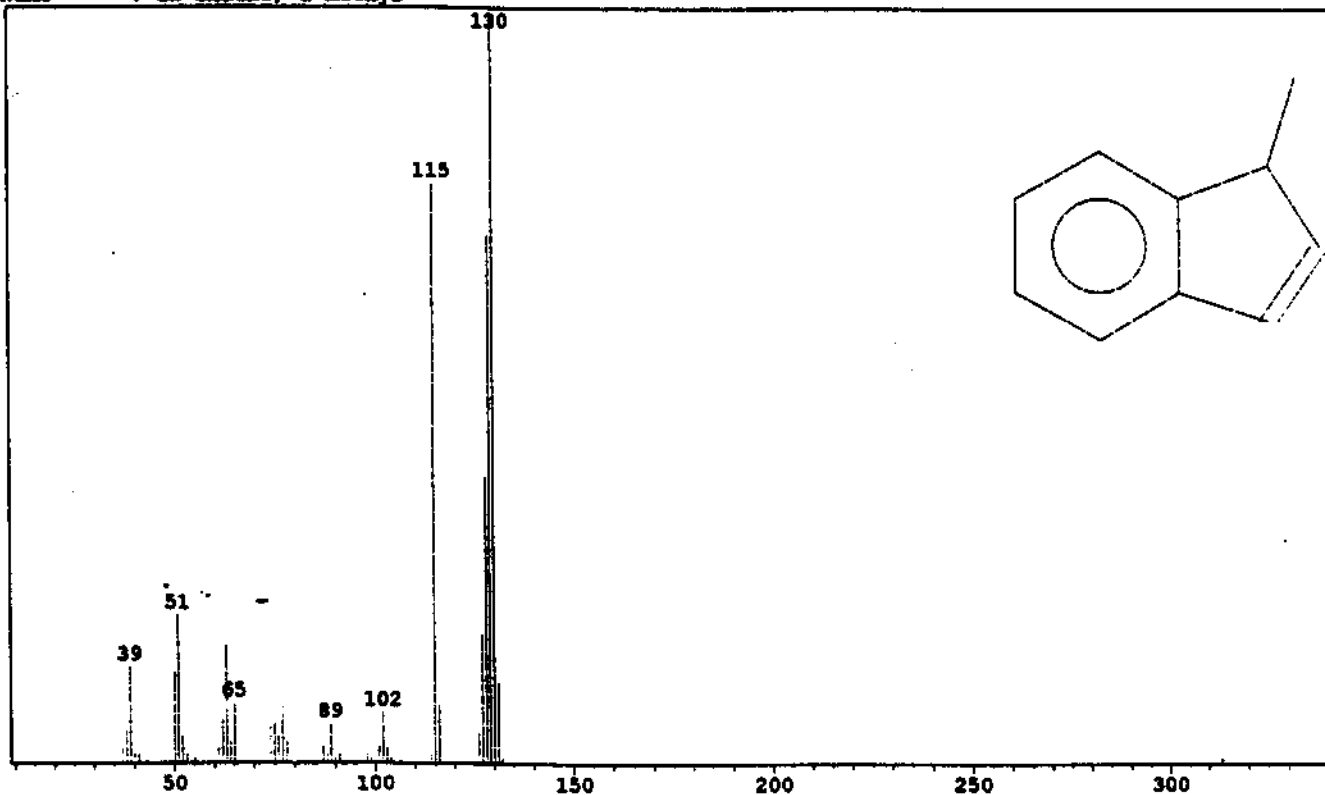
Data2 MIST62.LIB
Entry : 6730 CAS : 622-46-8 Mol.Wgt. : 137
Mol.Form. : C₇H₇NO₂
Name : Carbamic acid, phenyl ester 55 Phenyl carbamate



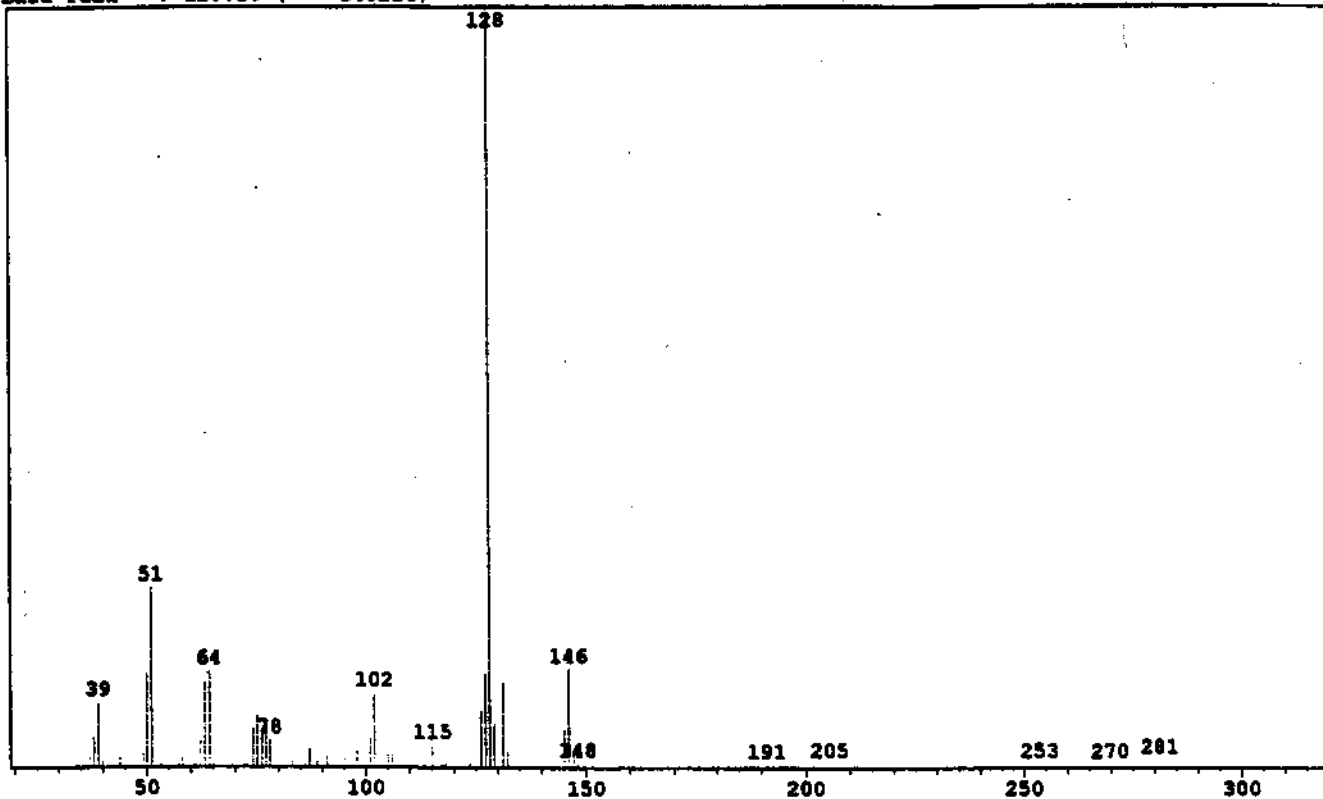
Scan # : 1251 B.G. Scan # : 1255
Mass Peak # : 84 Ret. Time : 24.833 B.G. Time : 24.900
Base Peak : 130.15 (120099)



Data2 NIST12.LIB
Entry : 3096 CAS : 767-59-9 Mol.Wgt. : 130
Mol.Form. : C₁₀H₁₀
Name : 1H-Indene, 1-methyl-



Scan # : 1326 B.G. Scan # : 1321
Mass Peak # : 69 Ret. Time : 26.083 B.G. Time : 26.000
Base Peak : 128.10 (548216)

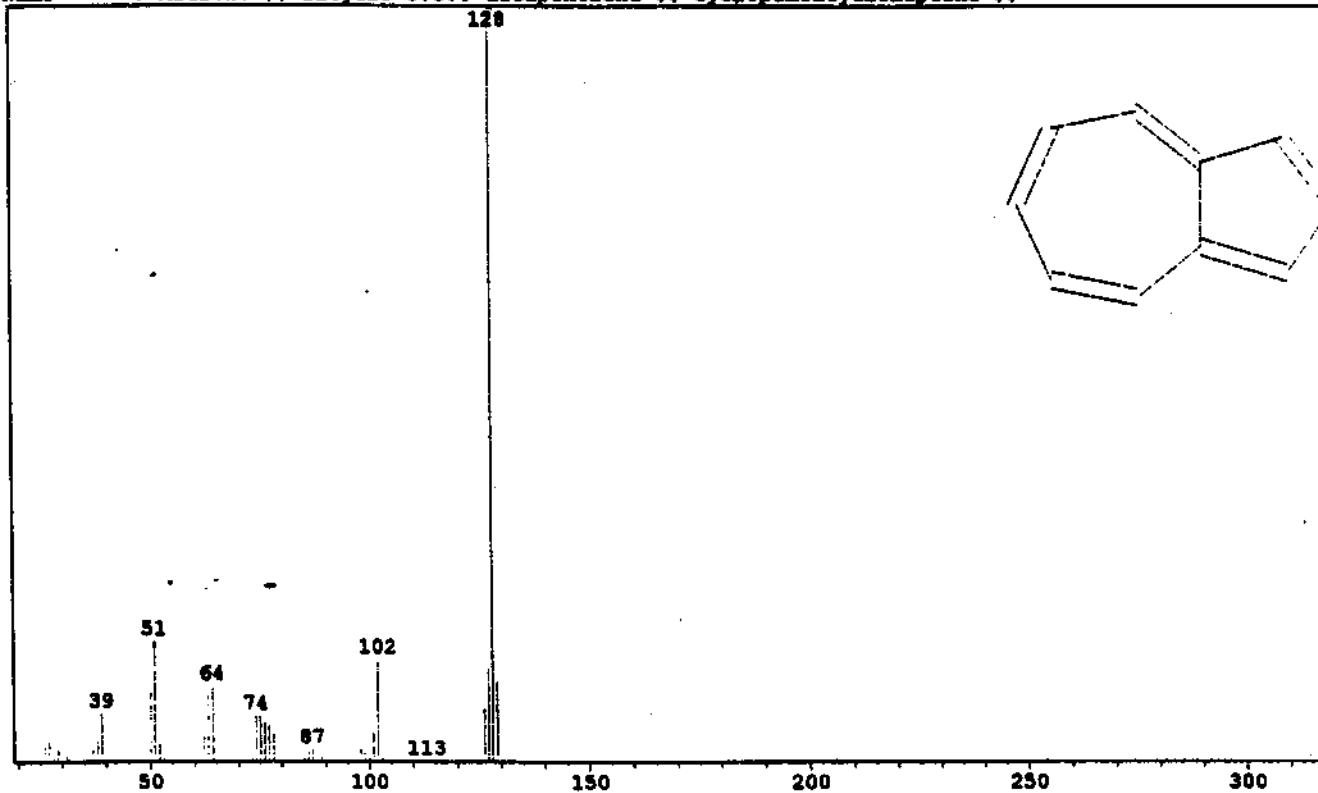


Data2 NIST62.LIB

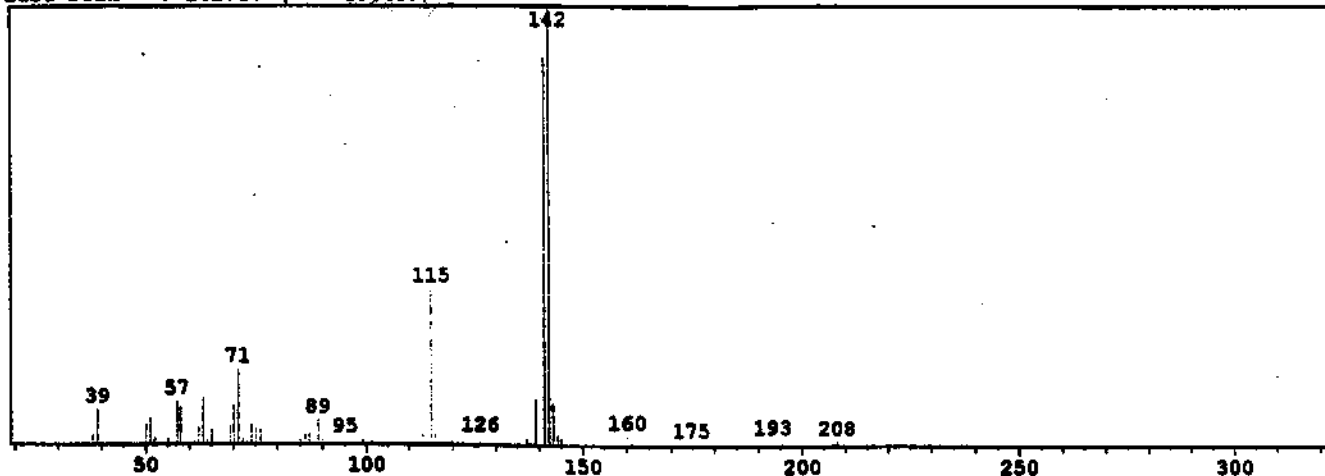
Entry : 5166 CAS : 275-51-4 Mol.Wgt. : 128

Mol.Form. : C₁₀H₈

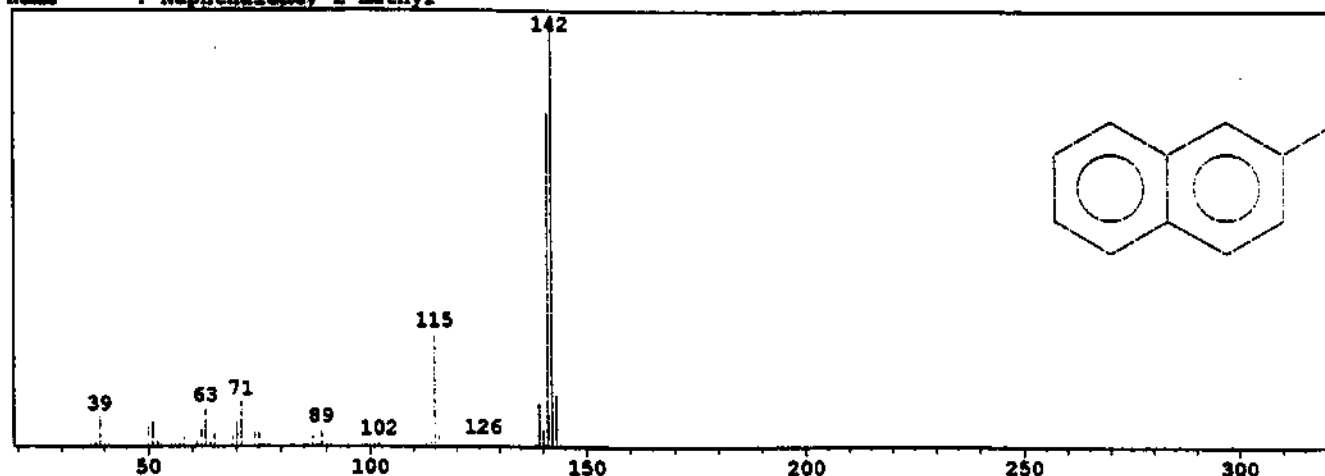
Name : Azulene ## Bicyclo 5.3.0 decapentaene ## Cyclopentacycloheptene ##



Scan # : 1549 S/G. Scan # : 1595
Mass Peak # : 75 Ret. Time : 29.800 B.G. Time : 29.900
Base Peak : 142.15 (399409)



Data2 NIST12.LIB
Entry : 4002 CAS : 91-57-6 Mol.Wgt. : 142
Mol.Form. : $C_{11}H_{10}$
Name : Naphthalene, 2-methyl-



Data3 NIST12.LIB
Entry : 3995 CAS : 90-12-0 Mol.Wgt. : 142
Mol.Form. : $C_{11}H_{10}$
Name : Naphthalene, 1-methyl-

