

**UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E BIOLÓGICAS**  
**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**EFICIÊNCIA DE ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS NA DETECÇÃO  
DE TOXICIDADE EM EFLUENTES DE REFINARIA DE PETRÓLEO**

Taísa Fedrizzi Maffazzioli

Caxias do Sul, 2011.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Universidade de Caxias do Sul  
UCS - BICE - Processamento Técnico

M187e Maffazzioli, Taisa Fedrizzi  
Eficiência de ensaios ecotoxicológicos na detecção de toxicidade em efluentes de refinaria de petróleo / Taisa Fedrizzi Maffazzioli. 2011.  
77 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2011.  
“Orientação: Prof. Dr.ª Rosane Maria Lanzer e Prof. Dr. Alois Eduard Schäfer”

1. Poluição causada por efluentes de petróleo. 2. Petróleo - Resíduos. 3. Efluentes líquidos industriais. 4. Tratamento de resíduos. 5. Controle da poluição. I. Título.

CDU : 504.5:665.6

Índice para catálogo sistemático:

1. Poluição causada por efluentes de petróleo	504.5:665.6
2. Petróleo - Resíduos	665.6
3. Efluentes líquidos industriais	628.4.038
4. Tratamento de resíduos	658.567
5. Controle da poluição	502.175

Catalogação na fonte elaborada pela bibliotecária  
Kátia Stefani – CRB 10/1683

Táisa Fedrizzi Maffazzioli

**EFICIÊNCIA DE ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS NA DETECÇÃO  
DE TOXICIDADE EM EFLUENTES DE REFINARIA DE PETRÓLEO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção de grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Dra. Rosane Maria Lanzer

Co-orientador: Dr. Alois Eduard Schäfer

Caxias do Sul, 2011

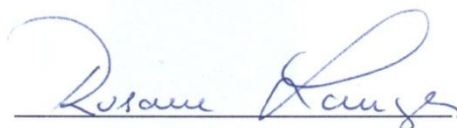
Taísa Fedrizzi Maffazzioli

AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS  
NA DETECÇÃO DE TOXICIDADE EM EFLUENTES DE REFINARIA  
DE PETRÓLEO

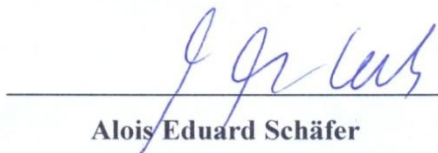
Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-graduação em Biotecnologia da  
Universidade de Caxias do Sul, visando à  
obtenção de grau de Mestre em  
Biotecnologia.

Orientadora: Dra. Rosane Maria Lanzer  
Co-orientador: Dr. Alois Eduard Schäfer

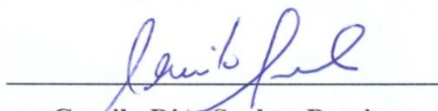
DISSERTAÇÃO APROVADA EM 15 DE ABRIL DE 2011.



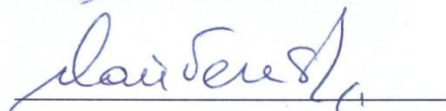
**Rosane Maria Lanzer**



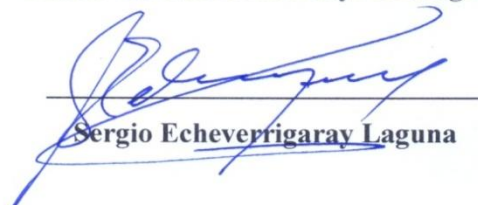
**Alois Eduard Schäfer**



**Camilo Dias Seabra Pereira**



**Maria Teresa Monica Raya Rodriguez**



**Sergio Echeverrigaray Laguna**

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais volta ao seu tamanho original.”

*Albert Einstein*

## AGRADECIMENTOS

Embora uma dissertação seja um trabalho individual, muitas pessoas fizeram parte desta para sua concretização. Diante disto, quero expressar os meus sinceros agradecimentos:

A Prof.<sup>a</sup> Dra. Rosane Maria Lanzer, pela confiança, críticas e sugestões relevantes feitas durante toda a orientação deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Alois Eduard Schäfer, por todo o aprendizado e sugestões e pela força dada durante a co-orientação desse estudo.

Aos Professores do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, pela contribuição em minha formação acadêmica, especialmente ao Prof. Dr. Aldo Dillon, pelos conselhos, pelo carinho e pela força.

Aos colegas do Laboratório de Toxicologia e Limnologia da UCS, pela ajuda, incentivo, amizade e companheirismo durante os estudos, principalmente aos amigos Elias Michalski, Thaiane da Silva, Talita Dallegrave, Jeane Paz, Aline Mazzoni, Cassiano Marchett, Manuel Riveros e Jaqueline Milani. Sem vocês as coisas não teriam sido fáceis!

A equipe do CQMA, IPEN/USP, pelo treinamento e todas as importantes informações repassadas, principalmente a Fabio Pusceddu, pela paciência, pelas conversas esclarecedoras e pelo apoio. Obrigada!

Aos meus amigos e amigas que revigoraram minha perseverança, incentivando-me a cada minuto. Agradeço principalmente à Carolina Pereira, Marina Müller, Mônica Paraboni, Annia Streher, Francieli Sbersi, Fernanda Albé, Renata Pereira, Vanessa Dalla Colletta, Laura Rudzewicz e Celina Bianco, por estarem ao meu lado em todas as etapas deste importante período de minha formação profissional.

A minha família, que me deu todo apoio, compreensão e incentivo que precisei durante esses dois longos anos, e que foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

A Universidade Petrobras pelo fomento à pesquisa, através da bolsa de mestrado e apoio financeiro a esse projeto, e à Ana Paula Torres, pelo apoio e informações prestadas.

Acima de tudo, agradeço a Deus, pelas oportunidades, desafios e pela presença constante em minha vida.

A todos que não foram citados aqui, mas que de uma forma ou de outra foram importantes durante a realização deste trabalho.

## RESUMO

Uma das principais fontes de poluição dos recursos hídricos são os efluentes líquidos industriais. Dentre esses, destacam-se os efluentes de refinaria de petróleo, pois geram efluentes bastante complexos e de difícil tratabilidade. Desta forma, evidencia-se a necessidade de monitoramento contínuo da qualidade desses efluentes, uma vez que são considerados de alto risco. Além do monitoramento físico-químico, o monitoramento biológico é uma importante ferramenta para avaliação da qualidade de efluentes. O objetivo desse trabalho foi avaliar a eficiência de quatro ensaios na determinação da toxicidade de efluente tratado de refinaria de petróleo. Foram realizados ensaios de toxicidade aguda com *Daphnia magna* e com bactérias aeróbias heterotróficas (Teste D), e ensaios de toxicidade crônica com *Ceriodaphnia dubia* e *Caenorhabditis elegans*. Os ensaios com *D. magna* seguiram a NBR 12713 (ABNT, 2004) e tiveram como *endpoint* a mortalidade. O Teste D foi baseado em Krebs (1985) e avaliou efeitos de estímulo ou inibição do consumo bioquímico de oxigênio (CBO). Ensaios com *C. dubia* avaliaram a mortalidade e a reprodução dos organismos, segundo a NBR 13373 (ABNT, 2005). Os ensaios com *C. elegans* foram realizados de acordo com a ISO/DIS 10872 (2009), e tiveram o crescimento e a reprodução como *endpoints*. As cinco amostras avaliadas foram provenientes de refinaria de petróleo do estado do Paraná. A análise estatística dos resultados mostrou que *C. elegans* foi o organismo mais sensível ao efluente, apresentando concentração de efeito observado (CEO) a partir de 12,5%, sendo classificado como organismo moderadamente sensível. Os ensaios com *C. elegans* e o Teste D apresentaram estímulo na concentração mais baixa, fenômeno conhecido como hormese. Esse fenômeno deveria ser considerado em avaliações ambientais uma vez que toda alteração na composição e estrutura de comunidades interfere na integridade dos ecossistemas.

## ABSTRACT

One of the main sources of water pollution is industrial wastewater. Among these, stands the waste of oil refinery effluents because is quite complex and of difficult tractability. Therefore, it is evident the need for continuous monitoring of the quality of these effluents, since they are considered high risk waste. In addition to monitoring physical and chemical, biological monitoring is an important tool for assessing the quality of effluents. The aim of this study was to evaluate the effectiveness of four tests in determining the toxicity of treated wastewater of oil refinery. Were performed acute toxicity tests with *Daphnia magna* and heterotrophic aerobic bacteria (D Test), and chronic toxicity tests with *Ceriodaphnia dubia* and *Caenorhabditis elegans*. Tests with *D. magna* followed the NBR 12713 (ABNT, 2004) and had the mortality as endpoint. The D Test was based on Krebs (1985) and assessed the effects of stimulation or inhibition of biochemical oxygen consumption (BOD). Tests with *C. dubia* evaluated the mortality rate and reproduction of organisms, according to NBR 13373 (ABNT, 2005). Tests with *C. elegans* were performed according to ISO / DIS 10872 (2009), and had the growth and reproduction as endpoints. The five evaluated samples were from an oil refinery in the state of Parana, Brazil. The statistical analysis showed that *C. elegans* was the most sensitive organism to the effluent, presenting the observed effect concentration (OEC) from 12.5%, which classified it as moderately sensitive organism. Tests with *C. elegans* and the D Test showed low-dose stimulation, a phenomenon known as hormesis. This phenomenon should be considered in environmental assessments because every change in communities composition and structure interferes in the ecosystems integrity.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Enriquecimento de substâncias tóxicas na pirâmide alimentar de um ecossistema terrestre (PAULUS, 1998).....	17
<b>Figura 2.</b> Níveis de organização biológica e resposta a efeitos de poluentes (MAGALHÃES & FERRÃO FILHO, 2008). .....	20
<b>Figura 3.</b> Fundamento da abordagem ecotoxicológica (FERNICOLA <i>et al.</i> , 2003).....	21
<b>Figura 4.</b> Esquema de redes tróficas mostrando a partilha entre dois ecossistemas: sistema herbívoro e sistema saprófago (DAJOZ, 2005).....	27
<b>Figura 5.</b> Tecnologias convencionais de tratamento de efluentes de refinaria (TORRES <i>et al.</i> , 2008).....	31
<b>Figura 6.</b> Tecnologias avançadas de tratamento de efluentes de refinaria (TORRES <i>et al.</i> , 2008).....	32
<b>Figura 7.</b> <i>Daphnia magna</i> Straus, 1820.....	36
<b>Figura 8.</b> Localização do ponto de coleta de água natural para cultivo de <i>Daphnia magna</i> . Represa do Samuara, Caxias do Sul, RS. ....	36
<b>Figura 9.</b> Represa do Samuara, Caxias do Sul, RS.....	37
<b>Figura 10.</b> Esquema do ensaio de toxicidade aguda com <i>Daphnia magna</i> . ....	39
<b>Figura 11.</b> Cultura de bactérias aeróbias heterotróficas utilizadas para o Teste de Dissimilação. ....	41
<b>Figura 12.</b> Teste de sensibilidade do cultivo de bactérias ao dicromato de potássio. ....	42
<b>Figura 13.</b> Fluxograma das atividades desenvolvidas no Teste de Dissimilação.....	43
<b>Figura 14.</b> <i>Ceriodaphnia dubia</i> Richard, 1894.....	44
<b>Figura 15.</b> Esquema do ensaio de toxicidade crônica com <i>Ceriodaphnia dubia</i> . ....	47
<b>Figura 16.</b> <i>Caenorhabditis elegans</i> Maupas, 1900.....	48
<b>Figura 17.</b> Esquema do ensaio de toxicidade crônica com <i>Caenorhabditis elegans</i> (adaptado de FOMIN <i>et al.</i> , 2003). ....	50
<b>Figura 18.</b> Média e desvio padrão da CBO nos Testes de Dissimilação realizados com efluente tratado de refinaria de petróleo. Letras diferentes indicam concentrações que diferem significativamente entre si. ....	53
<b>Figura 19.</b> Relação entre a taxa de dissimilação e a concentração das amostras no Teste D. A linha horizontal representa 10% de estímulo.....	54
<b>Figura 20.</b> Média e desvio padrão da reprodução de <i>Ceriodaphnia dubia</i> (número de neonatos/fêmea) nos ensaios de toxicidade crônica com efluente tratado de refinaria de petróleo. Letras diferentes indicam concentrações que diferem significativamente entre si. ..	55

<b>Figura 21.</b> Média e desvio padrão do crescimento e da reprodução de <i>Caenorhabditis elegans</i> nos ensaios com os lotes 1 e 2 de efluente tratado de refinaria de petróleo. Letras diferentes indicam concentrações que diferem significativamente entre si. ....	56
<b>Figura 22.</b> Média e desvio padrão do crescimento e da reprodução de <i>Caenorhabditis elegans</i> nos ensaios com os lotes 3 a 5 de efluente tratado de refinaria de petróleo. Letras diferentes indicam concentrações que diferem significativamente entre si. ....	57
<b>Figura 23.</b> Taxas de inibição do crescimento e da reprodução de <i>Caenorhabditis elegans</i> nos ensaios com efluente tratado de refinaria de petróleo. Letras diferentes indicam concentrações que diferem significativamente entre si. ....	58
<b>Figura 24.</b> Classificação da sensibilidade de <i>Ceriodaphnia dubia</i> e <i>Caenorhabditis elegans</i> testados com efluente de refinaria de petróleo, conforme Tabela 3. A) Avaliação do lote 1; B) Avaliação dos lotes 2, 3, 4 e 5. ....	59
<b>Figura 25.</b> Comparação da sensibilidade dos organismos ao efluente de refinaria de petróleo, conforme Tabela 2. ....	63

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.</b> Tecnologias de tratamento de água e efluentes nas refinarias de petróleo (COLLARES, 2004). .....	32
<b>Quadro 2.</b> Descrição e condições gerais dos ensaios utilizados no estudo. ....	35

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Data de recebimento das amostras e numeração utilizada nos ensaios. ....	34
<b>Tabela 2.</b> Classes de toxicidade segundo Krebs (2005) e níveis de sensibilidade dos organismos.....	51
<b>Tabela 3.</b> Mortalidade de <i>D. magna</i> ao final dos ensaios agudos (n=20) com efluente tratado de refinaria de petróleo. ....	52
<b>Tabela 4.</b> Taxas de dissimilação obtidas nos ensaios com o Teste D em efluente tratado de refinaria de petróleo.....	53

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. OBJETIVOS.....	16
2.1. OBJETIVO GERAL.....	16
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
3.1. CONTAMINANTES AMBIENTAIS.....	17
3.2. ECOTOXICOLOGIA E MEIO AMBIENTE.....	19
3.3. ENSAIOS DE ECOTOXICIDADE.....	22
3.3.1. Ensaio de toxicidade aguda.....	23
3.3.2. Ensaio de toxicidade crônica.....	24
3.3.3. Organismos-Teste.....	24
3.4. EFLUENTES.....	28
3.4.1. Efluentes de Refinaria.....	29
3.4.2. Tratamento dos efluentes de refinaria de petróleo.....	31
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	34
4.1. EFLUENTE TESTADO.....	34
4.2. CULTIVO E MANUTENÇÃO DOS ORGANISMOS.....	34
4.2.1. Ensaio de Toxicidade Aguda com <i>Daphnia magna</i> .....	35
4.2.1.1. Água de cultivo.....	36
4.2.1.2. Alimento.....	37
4.2.1.3. Manutenção dos cultivos.....	38
4.2.1.4. Teste de Sensibilidade.....	38
4.2.1.5. Avaliação dos Resultados.....	39
4.2.2. Teste de Dissimilação (Teste D).....	40
4.2.2.1. Manutenção das Culturas de Bactérias.....	40
4.2.2.2. Teste de Sensibilidade.....	41
4.2.2.3. Procedimento do Teste de Dissimilação.....	42
4.2.2.5. Análise Estatística.....	44
4.2.3. <i>Ceriodaphnia dubia</i> .....	44
4.2.3.1. Água de cultivo.....	44
4.2.3.2. Alimento.....	45

4.2.3.3. Manutenção dos cultivos .....	45
4.2.3.4. Teste de sensibilidade .....	46
4.2.3.5. Avaliação dos Resultados .....	46
4.2.4. <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	48
4.2.4.1. Condições de cultivo .....	48
4.2.4.2. Procedimento do ensaio .....	49
4.2.4.3. Validação dos resultados .....	50
4.2.4.4. Teste de Sensibilidade .....	50
4.2.4.5. Avaliação dos resultados .....	50
4.3. ANÁLISE DA SENSIBILIDADE DOS ENSAIOS .....	51
5. RESULTADOS .....	52
5.1. ENSAIOS DE TOXICIDADE AGUDA .....	52
5.1.1. <i>Daphnia magna</i> .....	52
5.1.2. Testes de Dissimilação .....	52
5.1.3. Comparação entre os Ensaios de Toxicidade Aguda .....	54
5.2. ENSAIOS DE TOXICIDADE CRÔNICA .....	54
5.2.1. <i>Ceriodaphnia dubia</i> .....	55
5.2.2. <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	56
5.2.3. Comparação entre os Ensaios de Toxicidade Crônica .....	58
6. DISCUSSÃO .....	60
7. CONCLUSÕES .....	65
8. REFERÊNCIAS .....	66
ANEXOS .....	76

## 1. INTRODUÇÃO

O aumento da poluição ambiental é paralelo ao desenvolvimento econômico, mas somente na década de 70 do século XX essa problemática foi reconhecida. Os sistemas de avaliação da qualidade ambiental estão muitas vezes baseados em análises físicas e químicas, as quais são pontuais e apresentam limitação de métodos, enquanto os componentes biológicos do ecossistema fornecem uma resposta integrada das alterações existentes. O principal objetivo das pesquisas ecotoxicológicas é verificar a contaminação dos ecossistemas pela influência antropogênica, entre outras, por substâncias químicas. Uma tarefa importante desse tipo de pesquisa é desenvolver e experimentar novos métodos de teste e estratégias que correspondam às possibilidades tecno-científicas, e desta forma melhor avaliar os riscos decorrentes dos compostos químicos no ambiente para as espécies e biocenoses complexas. Não somente a intensidade e a duração das modificações no ecossistema, mas também a relevância de uma possível influência nos ecossistemas vizinhos deve ser considerada.

Outro importante objetivo da pesquisa toxicológica é estabelecer, por meio da determinação do risco ambiental, uma ligação entre a toxicologia humana, que é o ramo da ciência que estuda as substâncias nocivas à saúde do homem, e a ecotoxicologia, que avalia os efeitos adversos de substâncias químicas sobre os ecossistemas. É necessária a inter-relação entre as duas áreas, especialmente na análise de efeitos em cadeia, da extrapolação do laboratório para a natureza, ou dos resultados obtidos em nível de populações e comunidades até o ecossistema. Cada nível de organização tem seus próprios mecanismos funcionais, que são potencialmente influenciáveis por substâncias químicas.

Uma das principais fontes de poluição dos recursos hídricos são os efluentes líquidos industriais. Técnicas de tratamento e gerenciamento de efluentes têm o objetivo de atingir os padrões legais de qualidade para o ambiente aquático e para proteção da saúde pública. Dentre os efluentes líquidos lançados no ambiente, destacam-se os efluentes de refinaria de petróleo. As indústrias petroquímicas, de um modo geral, geram efluentes líquidos bastante complexos, de difícil tratabilidade, apresentando maior ou menor toxicidade para os sistemas biológicos de tratamento, bem como para o meio receptor.

Muitos dos poluentes encontrados nas águas residuárias das indústrias petroquímicas são considerados cancerígenos para o homem e outros mamíferos, enquanto outros são considerados ruotores endócrinos. Desta forma, evidencia-se a necessidade de um sistema de tratamento eficiente e de um monitoramento contínuo da qualidade desses efluentes, uma vez que são considerados de alto risco ao meio ambiente e à saúde.

Além do monitoramento físico-químico, o monitoramento biológico é uma importante ferramenta para avaliação da qualidade de efluentes. Nos estudos de ecotoxicidade, avaliam-se os efeitos causados ao organismo-teste a partir da exposição, por período determinado, de organismos representativos do ambiente às várias concentrações do efluente ou da substância potencialmente tóxica. São avaliados os efeitos agudos, onde, geralmente, se avalia letalidade e imobilidade, e os efeitos crônicos, em que se observam alterações no crescimento, reprodução e sobrevivência.

Os ensaios multi-espécies mostram-se mais eficientes na determinação da toxicidade em virtude das distintas respostas relacionadas aos diferentes níveis de organização biológica. Entretanto, não existe ainda um consenso de qual o melhor tipo de organismo-teste para determinado efluente e nem qual conjunto de testes a ser desenvolvido para assegurar que os componentes e subprodutos da degradação de efluentes causem o menor impacto possível à biota aquática. Dessa forma, a necessidade de se identificar o grupo de ensaios mais adequados ao tipo de efluente a ser monitorado ainda é uma lacuna a ser preenchida pela toxicologia.



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

Avaliar a eficiência de ensaios de toxicidade aguda e crônica na determinação da toxicidade de efluente tratado de refinaria de petróleo.

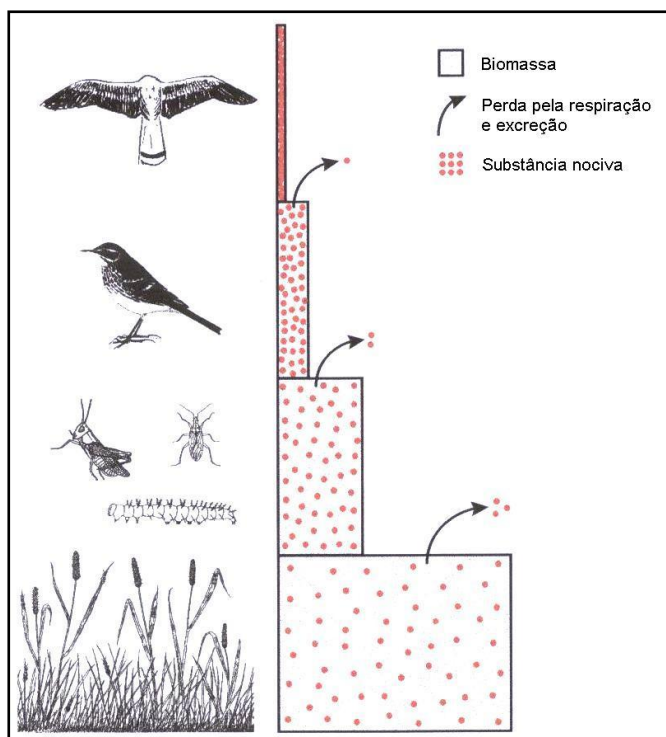
### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar a eficiência do Teste D e do ensaio com *Daphnia magna* para determinação da toxicidade aguda de efluente tratado de refinaria de petróleo;
- Avaliar a eficiência dos ensaios com *Ceriodaphnia dubia* e *Caenorhabditis elegans* para determinação da toxicidade crônica de efluente tratado de refinaria de petróleo;
- Comparar a eficiência dos diferentes ensaios, contribuindo para a melhoria da avaliação da toxicidade de efluentes tratados de refinaria.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. CONTAMINANTES AMBIENTAIS

A espécie humana altera profundamente e com grande rapidez o ambiente no qual se insere. O aumento da poluição ambiental é paralelo ao desenvolvimento econômico, mas somente na década de 70 essa problemática foi reconhecida (TAMBELLINI & CÂMARA, 1998). Com o desenvolvimento industrial, a contaminação da água, do ar e do solo tornou-se preocupante, sobretudo nas grandes cidades densamente povoadas. Dentre os contaminantes estão os metais pesados e compostos orgânicos, cujos níveis nos ecossistemas aquáticos e terrestres vêm aumentando anualmente. Estes elementos podem ser bioacumulados nos organismos e biomagnificados nas cadeias tróficas (Fig. 1), persistindo no ambiente e provocando distúrbios nos processos metabólicos dos seres vivos (TAVARES & CARVALHO, 1992).



**Figura 1.** Enriquecimento de substâncias tóxicas na pirâmide alimentar de um ecossistema terrestre (PAULUS, 1998).

Locais contaminados apresentam riscos ambientais significativos para o homem e os

ecossistemas, podendo resultar em efeitos ecotoxicológicos severos. Em áreas com alta contaminação ocorrem os chamados efeitos agudos, que ocorrem em curtos períodos de exposição; porém, o problema principal encontra-se nos possíveis efeitos em longo prazo. Compostos tóxicos interferem em todos os níveis de organização biológica, desde o mais simples (molecular) até mais complexo, o que pode afetar o ecossistema como um todo, alterando diretamente na sua estrutura e função (GUNKEL, 1994).

Alguns dos metais pesados considerados tóxicos são também nutrientes essenciais aos seres vivos, sendo requeridos em pequenas concentrações para sua sobrevivência (micronutrientes). Como exemplos, pode-se citar ferro e cobre, que são fundamentais para os organismos, sendo que sua ausência ou deficiência pode resultar em problemas de desenvolvimento (MAZON *et al.*, 2000). No entanto, a disponibilidade de altas concentrações desses elementos nos ecossistemas, provenientes da extração desses metais e de outros processos industriais, pode levar animais e vegetais a absorvê-los em quantidades excessivas, podendo assim, intoxicar-se (DAJOZ, 1979).

Segundo Hartmann (2004), análises ecotoxicológicas vêm sendo empregadas no monitoramento de efluentes industriais com o intuito de minimizar o impacto ambiental e avaliar a eficiência de estações de tratamento, além de ser requisito para a obtenção e manutenção de licenças junto aos órgãos ambientais de alguns estados.

O uso de invertebrados aquáticos, algas, bactérias e peixes como bioindicadores é importante para o monitoramento da toxicidade de efluentes, para o estabelecimento de um critério de qualidade que determine concentrações permissíveis de poluentes na água e a eficiência dos tratamentos empregados (BAPTISTA *et al.*, 2000). Ao contrário das análises químicas, as quais podem falhar na identificação de todas as substâncias potencialmente tóxicas devido ao limite dos métodos, os testes biológicos podem ser usados para obter uma medida integral da toxicidade de substâncias residuais e seus metabólitos (MARSCHNER, 1999). Normas técnicas biológicas permitem verificar o efeito de todas as substâncias contidas na água que estão biologicamente disponíveis, assim como seus efeitos sinérgicos e antagônicos (GUNKEL, 1994).

Testes de toxicidade podem ser definidos como procedimentos nos quais as respostas dos organismos-teste são utilizadas para detectar ou avaliar os efeitos adversos ou não de uma ou mais substâncias sobre os sistemas biológicos (LAITANO & MATIAS, 2006). Estes testes constituem-se basicamente na exposição de organismos a diferentes condições, visando assim a detectar seus efeitos letais e/ou subletais.

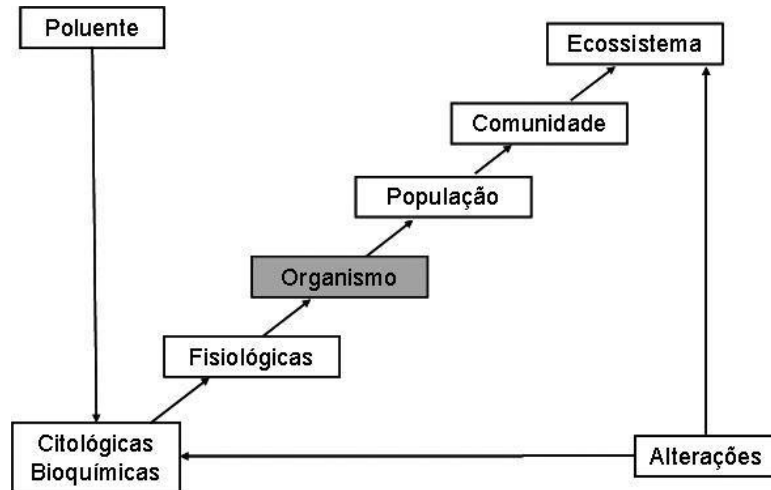
### 3.2. ECOTOXICOLOGIA E MEIO AMBIENTE

Desde a antiguidade, as respostas dos organismos vivos a diferentes tipos de estresse têm sido utilizadas para avaliar a qualidade do meio em que vivem (MAGALHÃES & FERRÃO FILHO, 2008). Há relatos de que Aristóteles (384-322 a.C.), considerado o pai da biologia, submeteu peixes de água doce à água do mar para estudar suas reações (MAGALHÃES & FERRÃO FILHO, 2008). O primeiro teste de toxicidade com organismos aquáticos que se tem registro foi realizado em 1816 com insetos aquáticos (BUIKEMA & VOSHELL, 1993). O termo ecotoxicologia foi sugerido pela primeira vez em junho de 1969, durante uma reunião do *Committee of the International Council of Scientific Unions (ICSU)*, em Estocolmo, pelo toxicologista francês René Truhaut (TRUHAUT, 1977). Segundo esse autor, a Ecotoxicologia é definida como a ciência que estuda os efeitos das substâncias naturais ou sintéticas sobre os organismos vivos, populações e comunidades, animais ou vegetais, terrestres ou aquáticos, que constituem a biosfera, incluindo assim a interação das substâncias com o meio nos quais os organismos vivem num contexto integrado (PLAA 1982, CAIRNS & NIEDERLEHNER 1995). Ramade (1977) publicou o primeiro livro de Ecotoxicologia, definindo-a como a ciência que tem por objetivo estudar as modalidades de contaminação do ambiente pelos poluentes naturais ou sintéticos, produzidos por atividades humanas, seus mecanismos de ação e seus efeitos sobre o conjunto de seres vivos que habitam a biosfera. Deste modo, a Ecotoxicologia nasceu como ferramenta de monitoramento ambiental, baseada principalmente na resposta de organismos individuais a estressores aquáticos.

A Sociedade Brasileira de Ecotoxicologia (SETAC-Brasil) define ecotoxicologia como “a ciência que tem como princípio básico o estudo dos efeitos dos agentes físicos, químicos e biológicos sobre os organismos vivos, particularmente sobre populações e comunidades em seus ecossistemas, incluindo as formas de transporte, distribuição, transformação, interações e destino final desses agentes nos diferentes compartimentos do ambiente”.

A Ecotoxicologia é uma ciência que estuda os contaminantes e seus efeitos nos constituintes da biosfera com o propósito de se conhecer ou avaliar os impactos das atividades humanas no ambiente. É uma ciência multidisciplinar e holística, pois aborda questões como efeitos tóxicos nos níveis celular (bioquímico e fisiológico), individual, e até níveis mais elevados de organização, como populacional, de comunidade, ecossistema e biosfera (NEWMAN & UNGER, 2003). O nível de organismo situa-se no meio da escala hierárquica

de resposta a estressores, integrando os níveis bioquímico, celular e fisiológico (Fig. 2). Portanto, antes que os efeitos possam se expressar no nível de populações, comunidades e ecossistemas, a resposta de organismos individuais fornece uma boa avaliação do risco de extinção local de alguns grupos de organismos susceptíveis.



**Figura 2.** Níveis de organização biológica e resposta a efeitos de poluentes (MAGALHÃES & FERRÃO FILHO, 2008).

Além disso, a Ecotoxicologia subsidia estudos sobre efeitos e transporte de substâncias químicas no meio ambiente (especiação, deposição e bioacumulação), e na biosfera (volatilização de pesticidas) (RAND *et al.*, 1995). Pode ser considerada um dos mais dinâmicos campos da ciência, preocupada em estudar como os ecossistemas metabolizam, transformam, degradam, eliminam, acumulam e sofrem ação da toxicidade dos produtos químicos que neles penetram (RAND *et al.*, 1995).

De acordo com Boudou & Ribeyre (1989), o princípio fundamental da ecotoxicologia é baseado na análise dos processos de transferência de contaminantes nos ecossistemas e nos efeitos sobre sua estrutura e funcionamento. Os ecossistemas são, por definição, estruturas unitárias, limitadas no tempo e no espaço, resultante da combinação do ambiente físico com a comunidade de organismos vivos (Fig. 3). Os fatores bióticos e abióticos caracterizam os ecossistemas e definem a base para qualquer abordagem ecotoxicológica. Os contaminantes incluem agentes físicos, químicos e, em alguns casos, biológicos, que podem originar perturbações nos ecossistemas e em seus compartimentos. Os fatores bióticos, abióticos e os contaminantes caracterizam-se por extrema diversidade, alterações contínuas no espaço e no tempo e por inúmeras formas de inter-relacionamento.

Como resultado, tem-se a hipercomplexidade de mecanismos ecotoxicológicos, em que os contaminantes trazem, ainda, outra dimensão para a dificuldade de caracterização dos estudos ecológicos (AZEVEDO & CHASIN, 2004).



**Figura 3.** Fundamento da abordagem ecotoxicológica (FERNICOLA *et al.*, 2003).

Segundo Abessa (2002), os estudos ecotoxicológicos podem ser empregados com diversas finalidades, dentre as quais se destacam o conhecimento da qualidade de águas, sedimentos, solos e ar; a regulação e a definição de limites máximos permissíveis para o lançamento de efluentes e substâncias químicas; as estimativas do efeito de descargas de contaminantes sobre as populações naturais; a significação biológica para dados de contaminação; a definição de áreas críticas; as análises de risco ecológico; a detecção dos primeiros sinais de impacto devido a compostos químicos (“*early warning*”); como integrantes em programas de monitoramento ambiental; e servir como prova legal em casos de despejos irregulares.

Embora o conceito de Ecotoxicologia seja amplo, abrangendo a totalidade do ecossistema, muito mais atenção tem sido dada aos efeitos em organismos individuais e poucos são os estudos com enfoque sistêmico (MAGALHÃES & FERRÃO FILHO, 2008). A visão ecossistêmica tem sido enfatizada ultimamente em uma nova abordagem que vem sendo denominada de Ecologia do Estresse (*Stress Ecology*) (VAN STRAALLEN, 2003). Nesta visão, o conceito de nicho ecológico assume grande importância, à medida que os agentes tóxicos frequentemente interagem com fatores de estresse naturais, como temperatura, pH, pressão osmótica e nutrição, principalmente quando os organismos estão nas bordas de sua amplitude ecológica – que é a faixa de condições ambientais na qual o organismo pode

sobreviver e reproduzir – e os efeitos dos toxicantes tornam-se mais severos (MAGALHÃES & FERRÃO FILHO, 2008).

Segundo Van Straalen (2003), para que haja um avanço na área da Ecotoxicologia, há que se fazer um esforço para diminuir o “enfoque de testagem” (*testing approach*) e trazer a Ecotoxicologia mais próxima da Ecologia.

Dentro da Ecotoxicologia, os ensaios de ecotoxicidade são consagrados como uma importante ferramenta de controle ambiental, que fornecem dados qualitativos e quantitativos sobre os efeitos adversos de estressores ambientais (COONEY, 1995), proporcionando uma evidência direta das consequências da contaminação, podendo ser utilizada para estimar a toxicidade de misturas complexas de contaminantes tanto em fase líquida, como na fase sólida do sedimento (CESAR *et al.*, 2002).

### 3.3. ENSAIOS DE ECOTOXICIDADE

Nos estudos de ecotoxicidade avaliam-se os efeitos causados ao organismo-teste, por meio da exposição de organismos representativos do ambiente a várias concentrações do efluente ou da substância potencialmente tóxica a ser testada, por período determinado. São avaliados os efeitos agudos, onde se observa letalidade e imobilidade, e os efeitos crônicos, em que se observam alterações no crescimento, reprodução e sobrevivência.

Ensaio de ecotoxicidade com organismos de águas continentais, estuarinas e marinhas, em condições laboratoriais ou de campo têm sido utilizados, nas últimas décadas, para identificar os efeitos de agentes tóxicos e substâncias químicas sobre a biota aquática. Esses testes possibilitam estabelecer limites permissíveis para várias substâncias químicas e, ainda, avaliar o impacto de misturas de poluentes sobre os organismos aquáticos dos corpos receptores (BERTOLETTI, 1990). Dessa forma, ensaios de ecotoxicidade são procedimentos nos quais as respostas de organismos vivos são utilizadas para avaliar a capacidade de substâncias químicas (isoladas ou em combinação) e amostras ambientais causarem efeitos deletérios nos organismos expostos (RAND *et al.*, 1995).

Segundo a CETESB (1990), toxicidade é a propriedade inerente de um agente químico de produzir efeitos danosos a um organismo quando este é exposto, por certo período, a determinadas concentrações desse agente, seja sob forma de substâncias químicas, efluentes ou amostras.

Os resultados de diversos ensaios toxicológicos que dão suporte à avaliação de toxicidade são expressos por curvas que demonstram a relação da dose/concentração de

determinado agente, com a resposta observada em determinado organismo ou população. A relação dose-resposta constitui importante fase da avaliação de risco (HACON, 2003).

A toxicidade das substâncias depende também do tempo de exposição dos organismos, e há várias razões para essa dependência. Alguns xenobióticos não são prontamente eliminados do organismo, assim, a exposição, mesmo que a pequenas doses, pode levar ao acúmulo do agente no organismo em níveis suficientes para exercer efeito tóxico. Outros, embora sejam eliminados com relativa rapidez, exercem efeitos e danos irreversíveis (USEPA, 1989).

Os ensaios de ecotoxicidade possuem uma série de vantagens para o controle ambiental, como baixo custo, obtenção de respostas rápidas, simplicidade da maior parte dos métodos, fácil interpretação dos resultados e evidências diretas das consequências da contaminação (CESAR *et al.*, 2002), além de fornecer parâmetros para emissão de poluentes no ambiente. Porém, esses ensaios possuem algumas limitações, pois não indicam qual o composto responsável pelo efeito tóxico, e a extrapolação dos resultados ao meio ambiente deve ser feita com muita cautela, visto que as condições de realização dos testes em laboratório são diferentes dos complexos processos que ocorrem na natureza (KNIE & LOPES, 2004).

Muitas tentativas têm sido feitas no sentido de tornar mais realista e aumentar a relevância ecológica dos testes de toxicidade, partindo de ensaios com espécies únicas para ensaios multi-espécies (comunidades, mesocosmos e testes *in situ*) (CHAPMAN *et al.*, 1992; GUIMARÃES *et al.*, 2003; BURTON *et al.*, 2005) e o uso de *endpoints* funcionais (produção primária, decomposição, etc.), em adição aos testes tradicionais que avaliam somente a sobrevivência, crescimento e reprodução de uma única espécie. Segundo Chapman (2002), outro tipo de resposta importante relacionada à relevância ecológica dos ensaios é a hormese, onde ocorre um efeito de resposta binária, apresentando, em baixas concentrações, reações opostas às obtidas em altas doses (CALABRESE, 2009). Esse efeito ainda não é suficientemente avaliado em ensaios ecotoxicológicos (BELZ *et al.*, 2008).

### **3.3.1. Ensaios de toxicidade aguda**

Segundo Rand & Petrocelli (1985), ensaios de avaliação da toxicidade aguda são procedimentos nos quais as respostas de organismos vivos permitem avaliar a capacidade de efluentes, amostras ambientais e substâncias químicas (isoladas ou combinadas), solúveis ou dispersas em água, de causar efeitos deletérios sobre os organismos expostos. Esse tipo de



ensaio é caracterizado por abranger um curto período do ciclo de vida dos organismos-teste e é importante para evidenciar os efeitos letais em curtos intervalos de tempo, fornecendo dados fundamentais para o desenvolvimento e adoção de critérios para melhoria da qualidade ambiental (FONSECA, 1991).

Ensaio de toxicidade aguda consiste em expor organismos-teste a diferentes concentrações de uma determinada amostra, por um período entre 0 e 96 horas. Após esse período de exposição, a mobilidade e mortalidade dos organismos são analisadas. O resultado é expresso através da concentração letal mediana (CL50), ou seja, a concentração do agente tóxico que provoca a mortalidade de 50% dos organismos após o período de exposição, ou através da concentração efetiva mediana (CE50), que é a concentração do agente tóxico que causa imobilidade a 50% dos organismos expostos. A concentração efetiva é a considerada mais confiável e significativa para ser extrapolada ao nível de população (CETESB, 1990).

### **3.3.2. Ensaio de toxicidade crônica**

Testes de avaliação da toxicidade crônica são procedimentos que permitem avaliar os efeitos subletais que efluentes, amostras ambientais e substâncias químicas provocam nos organismos expostos (RAND & PETROCELLI, 1985).

A partir dos dados de mortalidade e fecundidade, por exemplo, é possível determinar a concentração de efeito não observado (CENO) e a concentração de efeito observado (CEO) (ABNT, 2005). CENO é a maior concentração do agente tóxico onde não se observam efeitos deletérios estatisticamente significativos na sobrevivência e reprodução dos organismos durante o período de exposição, que pode abranger parte ou todo o ciclo de vida do organismo-teste. CEO é a menor concentração do agente tóxico onde efeitos deletérios estatisticamente significativos são observados na sobrevivência e reprodução dos organismos.

### **3.3.3. Organismos-Teste**

Muitas espécies de organismos vêm sendo empregadas em ensaios ecotoxicológicos, gerando subsídios importantes para uma melhor avaliação e caracterização dos efeitos agudos e crônicos de substâncias químicas, efluentes e amostras ambientais.

A escolha do organismo-teste é um fator essencial para o desenvolvimento de ensaios de toxicidade. Para isso, geralmente utilizam-se alguns critérios de seleção como ser espécie cosmopolita, sensível a vários contaminantes no meio, de significativa

representatividade ecológica, de fácil amostragem, baixa variabilidade genética, mobilidade limitada, e de fácil cultivo em laboratório a custos relativamente baixos (EPA, 2002b).

De acordo com a Resolução nº 129/06 do Conselho Estadual do Meio Ambiente (CONSEMA/RS, 2006), que define critérios e padrões de emissão para toxicidade de efluentes líquidos lançados em águas superficiais do estado do Rio Grande do Sul, os efluentes testados não devem apresentar toxicidade aguda quando submetidos a ensaios de toxicidade para organismos-teste de pelo menos três diferentes níveis tróficos. Essa exigência possibilita uma melhor caracterização do grau de toxicidade do efluente, corpo receptor ou amostra (RAND & PETROCELLI, 1985), obtendo-se resultados ecologicamente mais relevantes. Isto porque não existe uma única espécie de organismo-teste que represente integralmente os efeitos causados em um determinado ecossistema.

Diversos organismos são utilizados como bioindicadores. Entre eles, os mais comumente utilizados são as algas, representando os produtores; os microcrustáceos, representantes dos consumidores primários; e os peixes, como consumidores terciários.

Para esse trabalho foram selecionados quatro organismos-teste: para os ensaios de toxicidade aguda, o cladóceros *Daphnia magna* e um cultivo misto de bactérias aeróbias heterotróficas, o Teste D; e para os ensaios de toxicidade crônica, o cladóceros *Ceriodaphnia dubia* e o nematoda *Caenorhabditis elegans*.

Os cladóceros incluem cerca de 400 espécies de crustáceos (BRUSCA & BRUSCA, 2007) que fazem parte do zooplâncton e são representados por organismos conhecidos vulgarmente como pulgas d'água, que apresentam poucos milímetros de comprimento (geralmente de 0,5 a 6 mm) e vivem em águas correntes, grandes lagos e lagoas (RUPPERT & BARNES, 1996). A maioria é bentônica, mas existem espécies planctônicas, filtradores que obtêm alimento de materiais em suspensão (BRUSCA & BRUSCA, 2007). A partenogênese é comum nos cladóceros e uma fêmea pode produzir inúmeros jovens. Alterações dos fatores ambientais, como alteração da temperatura da água ou redução do suprimento alimentar, podem levar ao aparecimento de machos. Nessas situações, são produzidos ovos fertilizados, os efípios, que são muito mais resistentes, podendo suportar ressecamento, congelamento e até a passagem pelo intestino de peixes, aves e mamíferos (RUPPERT & BARNES, 1996).

*Daphnia magna* Straus, 1820 (Cladocera, Crustacea) é um microcrustáceo planctônico, de 5 a 6 mm de comprimento que atua como consumidor primário na cadeia alimentar aquática, alimentando-se por filtração de material orgânico particulado em suspensão, principalmente de algas unicelulares (KNIE & LOPES, 2004). Os organismos deste gênero são vulgarmente conhecidos como pulgas d'água e têm larga distribuição no

Hemisfério Norte (NBR 12713, 2004). Vivem de 40 a 56 dias, variando de acordo com a espécie e as condições ambientais; colocam de 6 a 10 ovos que eclodem em poucos dias e atingem a maturidade sexual entre o 6º e o 10º dia. A população consiste essencialmente de fêmeas que se reproduzem de forma assexuada, por partenogênese.

*Daphnia magna* foi selecionada para esta pesquisa devido a sua sensibilidade aos agentes tóxicos, por ser amplamente conhecida, facilmente cultivada e mantida em laboratório, por possuir descendentes geneticamente idênticos, o que assegura certa uniformidade de respostas nos ensaios, e por ser sensível a uma ampla gama de agentes nocivos.

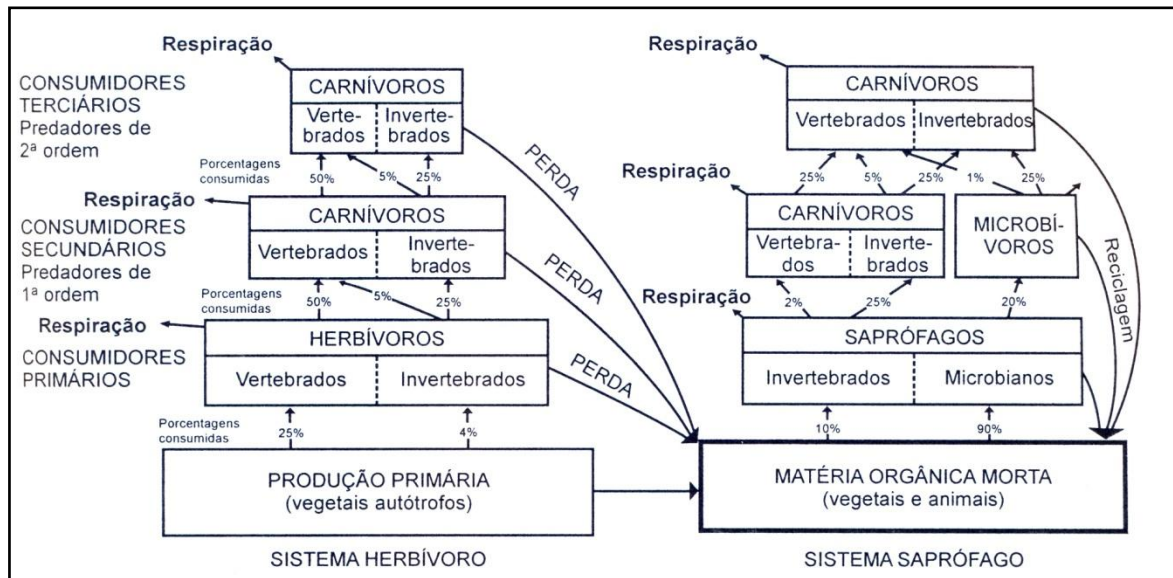
Os cladóceros do gênero *Ceriodaphnia* são animais importantes na cadeia alimentar em águas continentais. São cosmopolitas, de fácil amostragem, baixa variabilidade genética, mobilidade limitada, fácil cultivo em laboratório a custos relativamente baixos e sensíveis a vários contaminantes no meio (PUSCEDDU, 2009).

*Ceriodaphnia dubia* Richard, 1894 (Cladocera, Crustacea) tem sido utilizada como organismo-teste pela CETESB desde 1985 e é uma espécie padronizada para ensaios pela NBR 13373 (ABNT, 2005), apesar de não ocorrer naturalmente em regiões tropicais. *C. dubia* tem sido referida para áreas litorâneas de lagos, lagoas e pântanos na maior parte do mundo, mas é difícil determinar a sua distribuição real, pois ela tem sido relatada na literatura sob vários outros nomes (*C. affinis*, *C. quadrangula*, *C. reticulata*) (EPA, 2002b).

O filo Nematoda é um grupo muito diverso e ecologicamente importante de animais que habitam ambientes marinhos e de água doce, bem como sedimentos e solos, além de existirem muitas espécies parasitas. Existem mais de 12.000 espécies descritas e são vulgarmente conhecidos como vermes redondos (RUPPERT & BARNES, 1996).

*Caenorhabditis elegans* Maupas, 1900 (Nematoda), pertencente à família Rhabditidae, é um dos animais de laboratório mais intensamente estudados, do qual todas as células já foram rastreadas por todo o curso de desenvolvimento (RUPPERT & BARNES, 1996). Apresenta várias vantagens de uso em testes biológicos, principalmente por ser um animal hermafrodita, com plano corporal simples, número limitado de células e de fácil cultivo em laboratório. É um verme transparente, possui ciclo de vida curto, dimensões reduzidas, é tolerante a grandes amplitudes de pH, apresenta estágio de suspensão do desenvolvimento e seu pequeno genoma foi totalmente decifrado em 1998 (ALBERTS *et al.*, 2004).

Alguns autores consideram *C. elegans* como consumidor primário na cadeia trófica (HÖSS *et al.*, 2010; TRAUNSPURGER *et al.*, 1997). De acordo com Dajoz (2005), *C. elegans* é considerado, no sistema saprófago, um microbívoro (Fig. 4).



**Figura 4.** Esquema de redes tróficas mostrando a partilha entre dois ecossistemas: sistema herbívoro e sistema saprófago (DAJOZ, 2005).

*C. elegans* é bastante empregado em ensaios genéticos (genotoxicidade) (WOOD, 1988; MACQUEEN & VILLENEUVE, 2001; BOULTON *et al.*, 2002; RINALDO *et al.*, 2002; GARTNER *et al.*, 2004) e para avaliação da toxicidade de água intersticial, solos e sedimentos (DONKIN & DUSENBERRY, 1993; BARDGETT *et al.*, 1994; HÖSS *et al.*, 1997; TRAUNSPURGER *et al.*, 1997; BOYD *et al.*, 2000; FREEMAN *et al.*, 2000; BOYD & WILLIAMS, 2003; ANDERSON *et al.*, 2004); porém, é ainda pouco aplicado para testes de ecotoxicidade (GERHARDT *et al.*, 2002; SOCHOVÁ *et al.*, 2006). No Brasil, não há registros de ensaios ecotoxicológicos utilizando esse organismo. No último Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia – XI ECOTOX, realizado em setembro de 2010, o único trabalho apresentado utilizando *C. elegans* como organismo-teste pertencia ao Laboratório de Toxicologia da Universidade de Caxias do Sul, mesmo laboratório onde o presente estudo foi desenvolvido. Isso evidencia que esse organismo pode ser considerado uma novidade na área da ecotoxicologia brasileira e que sua aplicabilidade em ensaios ecotoxicológicos ainda é pouco conhecida.

Diversas normas técnicas utilizam bactérias na determinação de toxicidade aguda, como *Pseudomonas putida* (DIN 38412 L 8/1991), *Photobacterium phosphorium* (DIN 38412

L34/1991), *Escherichia coli*, *Enterobacter* sp., *Vibrio fischeri* (ABNT NBR 15411-1/2006), entre outros.

O teste de dissimilação foi desenvolvido a partir das observações de baixas demandas bioquímicas de oxigênio (DBO) em águas superficiais com uma elevada demanda química de oxigênio (DQO). Para quantificar a inibição das atividades de bactérias heterotróficas, foi desenvolvida uma metodologia padronizada do “potencial de respiração de oxigênio” em amostras incubadas a 20°C em estufas escuras. Foi observada uma alta interferência da quantidade e diversidade de substâncias orgânicas na água. Para reduzir este efeito, a padronização da metodologia incluiu uma adaptação de comunidades bacterianas heterotróficas ao consumo de peptona. Outra adaptação para simular os processos *in situ* foi a utilização de uma cultura mista de bactérias heterotróficas aeróbias oriundas de águas superficiais não poluídas.

O Teste de Dissimilação (Teste D) é um procedimento de orientação baseado na inibição de bactérias aeróbias heterotróficas adaptadas ao consumo de peptona. Este procedimento é parte integrante do Teste Assimilação e Dissimilação (Teste A-D) proposto por Krebs (1985), que visa detectar efeitos nocivos nos processos básicos de um ecossistema aquático.

Recentemente, o Teste A-D tem sido utilizado para avaliação do efeito de águas superficiais (CHIOCHETTA & CHIOCHETTA, 2006) e de sedimentos com alta poluição orgânica (FONTANELLA, 2007).

### **3.4. EFLUENTES**

O emprego de testes de ecotoxicidade para diversos poluentes em efluentes industriais permite avaliar possíveis impactos que a simples caracterização físico-química da água não revela (RUBINGER, 2009). Sabe-se que, isoladamente, essa constatação não é suficiente para se detectar a toxicidade das substâncias, uma vez que pode haver processos sinérgicos e antagônicos.

Segundo Araújo *et al.* (2008), no caso da indústria, após o processo de produção, a água é devolvida ao meio ambiente na forma de efluentes industriais, que contêm grande parte dos produtos químicos utilizados nas diversas fases dos processos produtivos. Uma vez que estes efluentes são devolvidos diretamente aos rios e lagos locais, a presença de poluentes e produtos químicos pode ocasionar danos para todas as populações e ecossistemas dependentes desta água (ARAÚJO *et al.*, 2008).

### 3.4.1. Efluentes de Refinaria

Refinarias de petróleo são um complexo sistema de operações múltiplas. As operações que são usadas em determinada refinaria dependem das propriedades do petróleo que será refinado, assim como dos produtos desejados (MARIANO, 2001). Por essas razões, as refinarias podem ser muito diferentes.

Além de o petróleo ser uma mistura extremamente complexa de diversos compostos, não existe dois tipos de petróleos idênticos. Sendo assim, suas diferenças vão influenciar de forma decisiva os rendimentos e a qualidade das frações que serão obtidas de cada petróleo (MARIANO, 2001).

As características do petróleo têm grande influência sobre a escolha das técnicas que serão adotadas para a sua refinação, e, de um modo geral, são elas que irão determinar quais serão os produtos que melhor poderão ser obtidos de um dado petróleo (MARIANO, 2001). Desta forma, os esquemas de refino variam significativamente de uma refinaria para outra.

Segundo Mariano (2001), de maneira geral, uma refinaria, ao ser planejada e construída, pode se destinar a dois objetivos básicos: produção de produtos energéticos (combustíveis e gases em geral) e produção de produtos não-energéticos (parafinas, lubrificantes, etc.) e petroquímicos.

As refinarias são grandes consumidoras de água, gerando, em contrapartida, grandes quantidades de despejos líquidos, alguns de difícil tratamento (Barcellos, 1986), que podem causar um grande impacto ambiental caso sejam lançadas como efluente nos rios de maneira direta.

Praticamente todas as operações de refino, desde a destilação primária até os tratamentos finais, requerem grandes volumes de água (NEMEROW, 1995). Grande parte dessa água é destinada ao resfriamento. A princípio, a água de refrigeração não entra em contato direto com as correntes de óleo, e, portanto, contém menos contaminantes do que a água de processo. A maior parte da água de refrigeração é reciclada indefinidamente.

A água usada nas diversas operações de processamento também contribui significativamente para a geração de efluentes. Tais efluentes são gerados nos processos de dessalinização do óleo cru, retificação com vapor, purga das caldeiras, etc. (MARIANO, 2001). As águas de processo frequentemente entram em contato direto com o óleo das correntes de processo, sendo normalmente, por esse motivo, muito contaminadas.

Basicamente, quatro tipos de efluentes são produzidos em uma refinaria: águas

contaminadas coletadas a céu aberto, águas de refrigeração, águas de processo, e efluentes sanitários (MARIANO, 2001).

A determinação da toxicidade aguda com efluentes de refinarias de petróleo data da década de 60 na Universidade de Oklahoma. Estes estudos começaram empregando diversas espécies de peixes, sendo que os cladóceros passaram a ser mais utilizados nas décadas de 70 e 80 (DAMATO *et al.*, 1997). A análise da toxicidade dos efluentes nas etapas de pré e pós-tratamento permitem estabelecer quais são os possíveis agentes tóxicos e sua capacidade de passar pelo sistema de tratamento. Entre os sistemas biológicos de tratamento, os sistemas de lodos ativados são os que estão sendo empregados mais frequentemente em refinarias dos Estados Unidos e Canadá. O estabelecimento de correlações entre as concentrações de compostos tóxicos presentes em águas residuárias e efluentes, e que são removidos na estação de tratamento de despejos industriais, com as respostas apresentadas pelos organismos indicadores nos ensaios biológicos com esses mesmos despejos é uma ferramenta muito útil que permite avaliar a remoção de cargas tóxicas (DAMATO *et al.*, 1997).

Segundo Chapman *et al.* (1994), cladóceros em geral possuem elevada sensibilidade a efluentes de refinaria de petróleo, caracterizando-se como bons bioindicadores para estudos nesta área. Buikema *et al.* (1976) verificou que *D. magna* podia ser até 40 vezes mais sensível a efluentes de refinaria de petróleo do que a espécie de truta *Salmo gairdneri*.

Dorris *et al.* (1972) realizaram ensaios de toxicidade com diversas refinarias de petróleo e determinaram a toxicidade do efluente para *D. magna*. Os pesquisadores constataram que não há um único poluente que seja responsável pela toxicidade em todas as refinarias, e avaliaram que os compostos que contribuem de forma majoritária para a toxicidade aguda são os orgânicos voláteis. Esse dado foi confirmado por Dorris *et al.* (1974), que observaram que a fração volátil apresentava maior toxicidade para esse organismo do que a fração não volátil. Os autores associaram esta toxicidade maior à presença de amônia, cianetos, sulfetos e hidrocarbonetos de 10 a 20 carbonos. Recce (1983) realizou pesquisas visando a determinação de frações de efluentes de refinaria de petróleo que causam toxicidade para *D. magna*. O autor verificou que a amônia causa toxicidade quando o efluente apresenta pH elevado. Constatou também a presença de diversos hidrocarbonetos aromáticos polinucleares e verificou que esses compostos isoladamente não apresentavam toxicidade, mas que, em conjunto, poderiam causá-la, evidenciando a presença de efeito sinérgico.

Matthews (1976) avaliou a redução da toxicidade de efluentes de refinaria em diversos sistemas de tratamento. O autor verificou a remoção da toxicidade em diversas fases do sistema de tratamento (API, bacia de equalização, lagoa aerada e lagoa facultativa) e concluiu

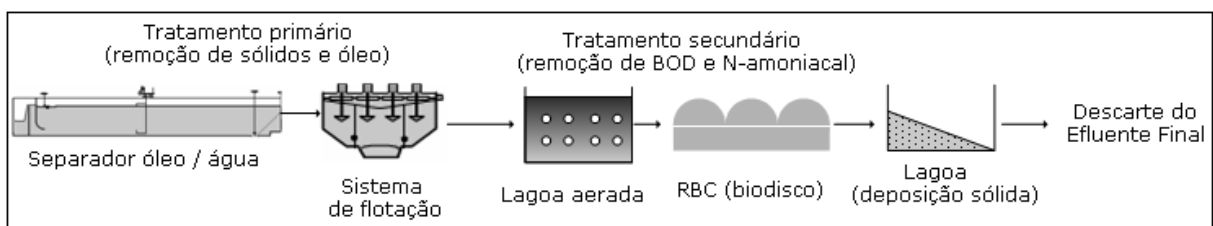
que o sistema de lodos ativados é muito eficaz na remoção de cargas tóxicas.

Para Stubblefield & Maki (1982), a presença de tratamento secundário em refinarias de petróleo reduz significativamente os impactos ambientais provocados pelos seus efluentes.

Esforços devem ser direcionados para aumentar a eficiência dos sistemas de tratamento de efluentes, melhorando assim a qualidade dos resíduos despejados no sistema. O desenvolvimento de novas tecnologias para tratamento de efluentes específicos ou de misturas resultantes de processos industriais é de extrema relevância para a minimização de impacto nos ecossistemas (TORRES *et al.*, 2008). A eficiência destes tratamentos deve, entretanto, ser avaliada não somente pelo grau de transformação de compostos, mas também pela redução dos níveis de toxicidade aguda e, especialmente, crônica.

### 3.4.2. Tratamento dos efluentes de refinaria de petróleo

As atuais estações de tratamento de efluentes industriais (ETDI) das refinarias de petróleo contemplam as etapas convencionais de tratamento primário físico-químico, para remoção de óleo e sólidos suspensos (separador gravimétrico tipo API e flotador), seguido de tratamento secundário biológico para remoção da matéria orgânica biodegradável, amônia e fenóis (lagoas aeradas, lodos ativados convencionais ou biodiscos) (Fig. 5) (TORRES *et al.*, 2008).



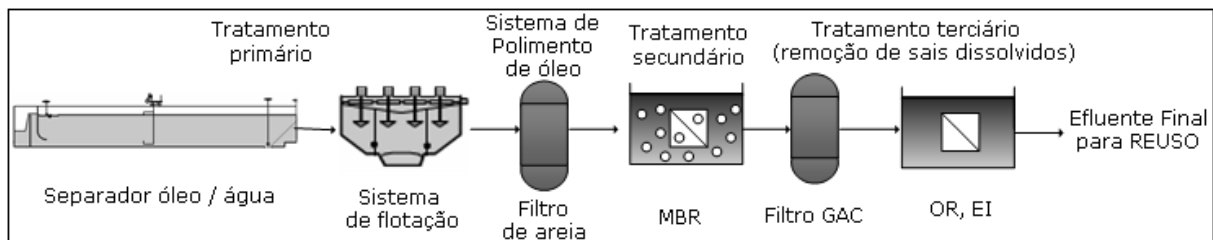
**Figura 5.** Tecnologias convencionais de tratamento de efluentes de refinaria (TORRES *et al.*, 2008).

O sistema de lodos ativados consiste basicamente na introdução de matéria orgânica em um tanque, onde uma cultura de bactérias aeróbias é mantida em suspensão, sob determinadas condições, de forma que essa matéria seja degradada (MIGUEL *et al.*, 2004). Os sólidos biológicos provenientes do tratamento secundário podem ser retidos em clarificadores secundários ou em lagoa de polimento (deposição de sólidos). Estas etapas de tratamento removem os poluentes prioritários, adequando o efluente tratado à legislação ambiental para descarte nos corpos receptores (TORRES *et al.*, 2008).



Para as novas estações de tratamento de efluentes (ETE), projetadas com a finalidade de viabilizar o reuso do efluente final, está sendo implantada a tecnologia de biorreatores à membrana (MBR) como tratamento secundário, sendo necessária, no tratamento primário, a implantação de um sistema não convencional de remoção de óleo (filtro de casca de nozes) como garantia da redução do teor de óleo ( $< 20\text{mg/L}$ ), visando à proteção das membranas poliméricas de microfiltração (TORRES *et al.*, 2008). O efluente do biorreator à membrana tem elevada qualidade e pode ser encaminhado, diretamente, para reuso como água de processo ou para as etapas de tratamento terciário de remoção de íons, etapa fundamental para viabilizar o reuso como água de reposição dos sistemas de refrigeração ou geração de vapor. Nesse sentido, duas tecnologias de tratamento terciário físico-químico têm sido avaliadas, a osmose reversa – OR, e a eletrodialise inversa – EI (Fig. 6).

A rota de reuso pode ser viabilizada pela aplicação de processo biológico através da tecnologia de biorreatores à membrana, que se destina à remoção de matéria orgânica e outros poluentes críticos, como amônia e fenóis, e também garante a ausência de sólidos (SST  $< 5\text{ mg/L}$ ) e microrganismos no efluente tratado.



**Figura 6.** Tecnologias avançadas de tratamento de efluentes de refinaria (TORRES *et al.*, 2008).

As tecnologias de tratamento de água e efluentes nas refinarias de petróleo encontram-se resumidas no Quadro 1.

**Quadro 1.** Tecnologias de tratamento de água e efluentes nas refinarias de petróleo (COLLARES, 2004).

Tecnologias de tratamento	Remoção específica	Aplicação
Clarificação	Remoção de turbidez	Torres de resfriamento
Filtração	Remoção de sólidos suspensos	Diversos e para potável
Cloração (desinfecção)	Micro-organismos patogênicos	Água potável
Adsorção com carvão ativado	Compostos orgânicos refratários	Proteção das cadeias de troca iônica e remoção de DQO em lodo ativado
Desmineralização	Íons metálicos, sólidos totais dissolvidos	Geração de vapor

Microfiltração	Partículas até 0,1 µm	Pré-tratamento para osmose reversa
Ultrafiltração	Partículas até 0,01 µm	Torres de resfriamento e diversos
Nanofiltração	Partículas até 0,001 µm	-
Osmose reversa	Partículas até 0,0001 µm	Geração de vapor de baixa e média pressão
Eletrodialise	Íons metálicos, SDT	-
Eletrodeionização	Íons metálicos, SDT	-
Retificação ( <i>stripping</i> )	Amônia, gás sulfídrico, VOCs, CO <sub>2</sub>	Pré-tratamento para EDTI e recuperação de enxofre
Separação por gravidade	Óleo e graxa	Tratamento de efluente final e recuperação de óleo
Flotação	Remoção de óleos e sólidos suspensos	Pré-tratamento para sistema biológico
Centrifugação	Separação de lodo	Reuso de água
Lagoas de estabilização	Matéria orgânica	Tratamento do efluente
Filtros biológicos	Matéria orgânica	Tratamento do efluente
Lodos ativados	Matéria orgânica	Tratamento do efluente
Recarbonatação	Fósforo	-
Ozonização	DQO	-

O efluente tratado proveniente de refinaria de petróleo, utilizado para a realização dos ensaios de toxicidade nesse estudo, não veio acompanhado da análise de sua composição química. Relatórios sobre os resultados dos ensaios de toxicidade com efluentes de refinaria de petróleo muitas vezes não são de domínio público (DAMATO *et al.*, 1998). Segundo Mariano (2001), os efluentes líquidos de refinaria consistem basicamente em águas de resfriamento, águas de processo, águas dos esgotos e águas da chuva. Muitas refinarias liberam, não intencionalmente, hidrocarbonetos líquidos no solo ou mesmo em águas superficiais. Dentre os contaminantes usualmente encontrados, estão os cloretos, cianetos, sulfetos, mercaptanos, compostos fenólicos, naftênicos, nitrogenados e organosulfurados, ácidos sulfídrico, sulfúrico e fluorídrico, carbonatos, hidróxidos de sódio, de cálcio e de amônia, óleo livre e emulsionado, sólidos em suspensão, alta DBO e DQO, metil-etil-cetona, metais pesados (chumbo, ferro, níquel, cromo, cádmio e cobre), sabões, etc. (MARIANO, 2001; HOSHINA & MARIN-MORALES, 2010).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Toxicologia e Limnologia do Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul (UCS).

### 4.1. EFLUENTE TESTADO

As amostras simples de efluente testadas procederam de refinaria de petróleo situada no estado do Paraná.

O tratamento do efluente foi realizado por sistema de lodos ativados convencional, conforme citado anteriormente, no item 3.4.2.

As coletas foram realizadas mensalmente, na primeira semana de cada mês, por técnicos da refinaria e encaminhadas ao Laboratório de Toxicologia da Universidade de Caxias do Sul sob refrigeração e ao abrigo da luz, no período de outubro de 2009 a junho de 2010 (exceto janeiro de 2010). Para facilitar a organização dos dados, as amostras foram numeradas de 1 a 6, de acordo com a data de recebimento, como consta na Tabela 1.

**Tabela 1.** Data de recebimento das amostras e numeração utilizada nos ensaios.

<b>Lote</b>	<b>Coleta da amostra</b>
1	Dezembro/2009
2	Fevereiro/2010
3	Março/2010
4	Abril/2010
5	Maió/2010
6	Junho/2010

Na impossibilidade de iniciar o ensaio em até 12 horas, as amostras foram congeladas a temperaturas inferiores a -18°C por até 60 dias. Antes do ensaio, a amostra foi descongelada por completo à temperatura ambiente. A manipulação das amostras foi sempre efetuada em local com temperatura entre 10°C e 30°C (EPA, 2002b).

### 4.2. CULTIVO E MANUTENÇÃO DOS ORGANISMOS

Os ensaios utilizados na avaliação da toxicidade são mostrados resumidamente no

Quadro 2.

**Quadro 2.** Descrição e condições gerais dos ensaios utilizados no estudo.

Tipo de ensaio	Toxicidade Aguda		Toxicidade Crônica	
	Organismo-teste	<i>Daphnia magna</i>	Bactérias aeróbias heterotróficas	<i>Ceriodaphnia dubia</i>
Procedência	FEPAM-RS	Arroio na Cidade Universitária da UCS	IPEN-USP	Genetics Center, Minessotta, USA
Norma técnica	NBR 12713 (ABNT, 2004)	Krebs (1985)	NBR 13373 (ABNT, 2005)	ISO/DIS 10872 (2009)
Parâmetro de toxicidade	Mortalidade	Inibição do consumo de O <sub>2</sub>	Reprodução (número de neonatos/fêmea) e Mortalidade	Reprodução (neonatos/fêmea) e Crescimento (comprimento do corpo)
Temperatura	20 ± 2°C	20 ± 2°C	25 ± 2°C	20 ± 2°C
Período de teste	48h	24h	7-8 dias	96h
Alimentação	-	Peptona	<i>P. subcapitata</i>	<i>E. coli</i> OP50
Replicatas	4	3	10	6
Crítérios de validação do controle	Mortalidade ≤ 10%	CBO 5mg/L ±1	Mortalidade ≤ 20%, 15 neonatos/fêmea	30 neonatos/fêmea, sensibilidade ao BAC*

\* BAC: cloreto de benzalcônio, substância de referência.

#### 4.2.1. Ensaios de Toxicidade Aguda com *Daphnia magna*

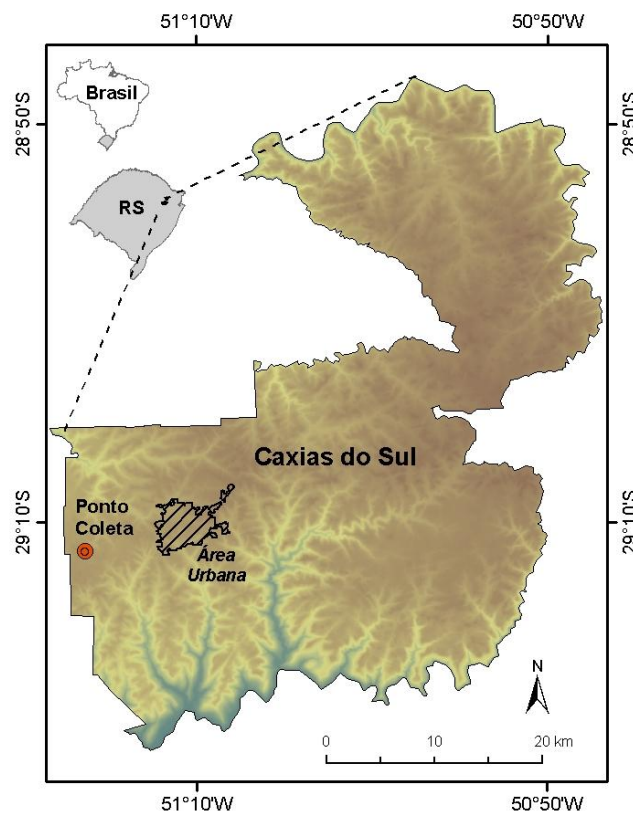
As culturas de *D. magna* (Fig. 7) utilizadas no trabalho foram cedidas pela Fundação Parque Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luiz Roessler – FEPAM/RS, e são cultivadas no laboratório de Toxicologia e Limnologia da UCS desde 2002.



**Figura 7.** *Daphnia magna* Straus, 1820  
(Fonte: <http://www.mblaquaculture.com/content/organisms/daphnids.php>)

#### 4.2.1.1. Água de cultivo

A metodologia de cultivo do organismo-teste *D. magna* seguiu o descrito na NBR 12713 (ABNT, 2004) e EPA (2002a).



**Figura 8.** Localização do ponto de coleta de água natural para cultivo de *Daphnia magna*. Represa do Samuara, Caxias do Sul, RS.

A coleta da água utilizada nos cultivos e testes foi realizada na Represa do Samuara, em Caxias do Sul, RS (Figs. 8 e 9). Este ponto de coleta foi escolhido por ser um reservatório destinado ao abastecimento público. Antes de sua utilização, foram realizadas análises de metais pesados pela Central Analítica da Universidade de Caxias do Sul (Anexo 1).

As coletas foram feitas na superfície d'água, em galões de 20L, que foram posteriormente armazenados em sala climatizada a  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ . Para utilização, a água foi filtrada em rede de plâncton com malha de  $10\mu\text{m}$  e teve a dureza ajustada entre 175 e 225 mg/L  $\text{CaCO}_3$ , permanecendo sob aeração por um período mínimo de 24 horas para total diluição dos sais (ABNT, 2004).



**Figura 9.** Represa do Samuara, Caxias do Sul, RS.

Antes de sua utilização para os testes e cultivos, a água teve seu pH ajustado para 7,8 ( $\pm 0,2$ ) sob temperatura de  $21^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ . A condutividade manteve-se em torno de  $300 \mu\text{S}/\text{cm}$  e o OD entre 5 mg/L e 8,5 mg/L (ABNT, 2004).

#### **4.2.1.2. Alimento**

Como alimento, utilizou-se a alga verde *Pseudokirchneriella subcapitata* à quantia de aproximadamente  $10^6$  células/mL por organismo adulto a cada manutenção.

A alga foi cultivada em meio aerado, com iluminação constante, à intensidade luminosa de aproximadamente 2800 LUX, e temperatura média de  $20^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$  (ABNT, 2004).

Semanalmente, às sextas-feiras, o estoque de algas foi renovado. O lote que permaneceu sob aeração e iluminação constantes por uma semana foi utilizado para alimentação de *D. magna*. Para isso, as culturas foram centrifugadas por duas vezes a 2400rpm por 15min para retirar o excesso do meio de cultura algáceo. O sobrenadante foi descartado e a alga ressuspendida com o meio de cultivo de *D. magna*. Esse procedimento evita a introdução de nutrientes presentes no meio de cultura algáceo, que podem ser tóxicos aos organismos-teste.

Além da alga, os organismos receberam um complemento alimentar a base de ração de peixe, combinada com fermento biológico fermentado e com teor de sólidos em suspensão calculado em 0,045 g/mL.

O fornecimento de alimento ocorreu durante a manutenção, três vezes por semana.

#### **4.2.1.3. Manutenção dos cultivos**

As culturas foram mantidas em sala climatizada, com luminosidade de cerca de 2000 LUX, fotoperíodo de 16 horas-luz à temperatura de  $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Os organismos foram mantidos em lotes de 25 adultos por litro, em recipiente de 1000 mL. A água do cultivo foi renovada três vezes por semana, as segundas, quartas e sextas-feiras.

Para o manuseio do organismo utilizou-se pipeta de diâmetro adequado ao tamanho do mesmo, com borda arredondada para evitar o estresse ou até mesmo danos físicos dos organismos. Lotes de organismos com idade superior a 60 dias foram descartados.

Na substituição do meio, os indivíduos jovens, quando não utilizados nos ensaios, foram mortos e descartados. O descarte dos neonatos foi feito por meio da fervura em água de cultivo.

#### **4.2.1.4. Teste de Sensibilidade**

Os organismos-teste *D. magna* foram testados em nível de sensibilidade, visando assegurar a qualificação dos mesmos dentro dos padrões internacionais e garantir a validação dos testes realizados, conforme NBR 12713 (ABNT, 2004). Para tal, realizaram-se testes de toxicidade aguda com a substância de referência Cloreto de Sódio (NaCl) nas concentrações de 4g/L, 5g/L, 6g/L, 7g/L, 8g/L.

Em cada concentração foram utilizadas quatro réplicas com cinco indivíduos cada, totalizando 20 organismos expostos por concentração. Os valores de CE(I)50;48h

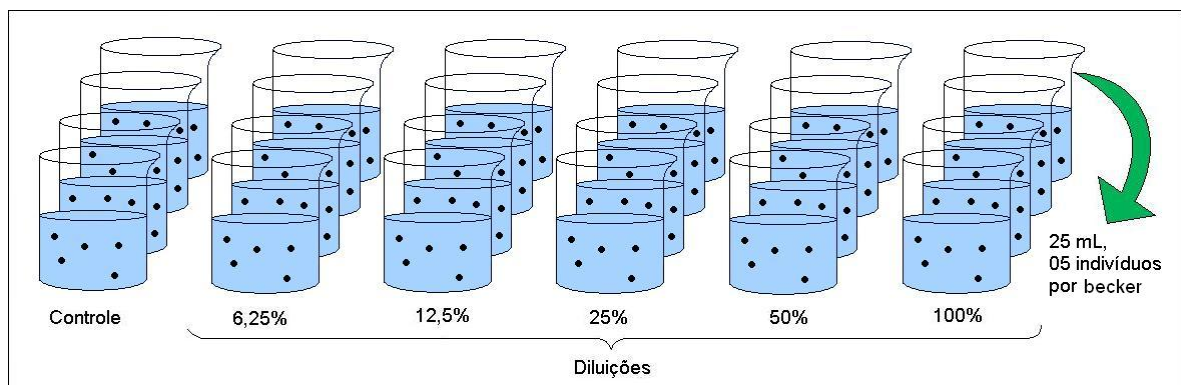
(concentração efetiva inicial mediana, ou seja, a concentração da amostra que causa efeito agudo a 50% dos organismos em 48h) foram determinados pelo método de Spearman (HAMILTON *et al.*,1979).

Na carta-controle, a faixa estabelecida para CE(I)50;48h variou entre 4,10 e 6,42 g/L NaCl. O valor médio obtido foi de 5,62 g/L NaCl (Anexo 2).

#### 4.2.1.5. Avaliação dos Resultados

O ensaio para avaliação da toxicidade aguda com *D. magna* seguiu o descrito na norma NBR 12713 (ABNT, 2004). Para a realização dos testes de toxicidade, neonatos com idade entre 2 e 26 horas de idade foram expostos a soluções contendo o efluente.

A partir da amostra foram preparadas cinco diluições: 100%, 50%, 25%, 12,5% e 6,25%, além do controle contendo meio de cultivo. Cada diluição foi colocada em quatro copos de becker de 50 mL, com volume final de 25 mL contendo cinco organismos, totalizando 20 organismos por diluição (Fig. 10). Seguindo a norma NBR 12713 (ABNT, 2004), o ensaio é considerado válido quando a mortalidade do controle não for superior a 10%.



**Figura 10.** Esquema do ensaio de toxicidade aguda com *Daphnia magna*.

Os organismos-teste foram acrescentados aos copos de becker, fazendo-se a distribuição sempre da menor para a maior concentração do agente tóxico, iniciando pelo controle. Os frascos foram cobertos com filme PVC e levados para a incubadora de teste, a  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ .

Durante o teste, os organismos não foram alimentados. Após 48h contabilizou-se o número de indivíduos imóveis e calculou-se a porcentagem de imobilidade por concentração. O resultado do teste aponta a menor quantidade de diluição que causa efeito agudo sobre os



organismos. Foi calculada a CE50 (concentração efetiva que provoca mortalidade de 50% dos organismos no período de 48 horas) e avaliada a toxicidade em relação ao controle, através do método estatístico de Spearman, sugerido pela EPA (Environmental Protection Agency, USA).

#### **4.2.2. Teste de Dissimilação (Teste D)**

Para o Teste de Dissimilação, foram obtidas bactérias aeróbias heterotróficas a partir de uma incubação com água de arroio (UTM 485948-6773971), próximo ao bloco 57 da Cidade Universitária da UCS.

As bactérias provenientes do arroio foram adaptadas ao consumo de peptona. Esta adaptação foi feita para reduzir o consumo de eventuais substâncias biodegradáveis no meio a ser testado, causando um aumento da taxa de decomposição aeróbia das amostras. Este evento pode mascarar um eventual efeito tóxico. Pela adaptação, reduz-se este efeito, mas torna-se impossível eliminá-lo por completo. A peptona foi escolhida para a manutenção das bactérias porque apresenta uma composição similar a substâncias orgânicas contidas em esgotos cloacais.

##### **4.2.2.1. Manutenção das Culturas de Bactérias**

As culturas de bactérias foram mantidas em três aquários de vidro de 50L, sob aeração constante em sala climatizada ( $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) sem iluminação (em caixas de madeira), para evitar contaminação por algas (Fig. 11). Deste volume total, 10% compreenderam areia grossa lavada e esterilizada, 10% de água do arroio e 80% de água reconstituída.

A água reconstituída foi composta por 970 mL de água deionizada, 20mL de solução 1 e 10mL de solução 2. A solução 1 é constituída por 1,5g de  $\text{CaSO}_4$  para um volume final de 1000 mL, e a solução 2 é constituída por 0,2g de KCl, 4,8g de  $\text{NaHCO}_3$  e 6,1g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  também para um volume final de 1000mL.

A manutenção dos aquários foi realizada diariamente. Para isso, um litro de água foi retirado para as medidas do CBO (Consumo Bioquímico de Oxigênio) e 75 ml de peptona foi adicionada. Antes da adição, a peptona foi diluída em água reconstituída. O objetivo foi a manutenção de uma água com baixo potencial de consumo de oxigênio. Para o teste, o volume retirado não ultrapassou 10% do volume total do aquário, sendo imediatamente completado com água reconstituída.



**Figura 11.** Cultura de bactérias aeróbias heterotróficas utilizadas para o Teste de Dissimilação.

A água de dissimilação retirada para o teste, correspondente a 1L, foi colocada em três frascos Winkler e feita a medição da concentração de oxigênio inicial com oxímetro WTW Oxi-315. Após um período de 24h, mantidos sob  $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  sem iluminação, foi medido o teor de oxigênio novamente. O valor do CBO diário foi obtido pela diferença entre os valores iniciais e finais. O valor desejado do CBO, sob condições controladas, varia em torno de 0,5 mg/L, de acordo com Krebs (1985). Este nível baixo do CBO permite uma resposta imediata na adição de peptona na realização do teste.

#### **4.2.2.2. Teste de Sensibilidade**

Após o estabelecimento dos aquários, foram realizados testes de sensibilidade com dicromato de potássio ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) para verificar a resposta do cultivo.



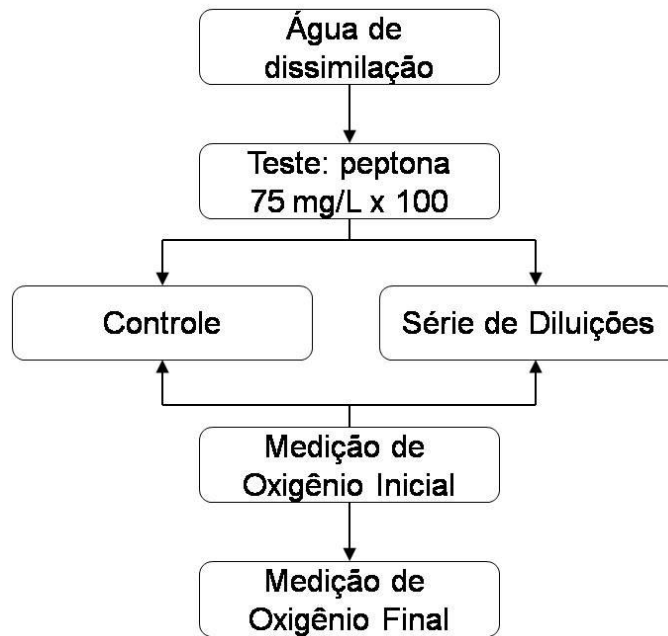
**Figura 12.** Teste de sensibilidade do cultivo de bactérias ao dicromato de potássio.

Foram utilizadas três réplicas de cada concentração, sendo elas 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 e 1:64, além do controle, que foi feito com água de dissimilação (Fig. 12). O teste de sensibilidade foi conduzido de acordo com os procedimentos do Teste D: temperatura de 20°C ( $\pm 2$ ) durante 24h, no escuro. Os valores do CBO verificados no controle foram utilizados como referência para calcular a taxa de inibição frente à exposição ao dicromato de potássio. As bactérias se mostraram sensíveis à substância de referência, apresentando inibição do CBO em até 99% nas diluições avaliadas, tornando válidos os ensaios.

#### 4.2.2.3. Procedimento do Teste de Dissimilação

O Teste de Dissimilação requer a exposição dos frascos com as amostras a uma temperatura de 20°C ( $\pm 2$ ) durante 24h, no escuro. Os valores do CBO verificados no controle são utilizados como referência para calcular a taxa de estímulo ou inibição.

O procedimento do Teste D encontra-se esquematizado na Figura 13. Foram testadas as concentrações de 50%, 25%, 12,5% e 6,25% da amostra. O controle foi feito com a água de Dissimilação adicionada de 20 mg de peptona (100 vezes a concentração da água de manutenção da cultura das bactérias). As diluições foram feitas com essa mesma água mais o volume do meio a ser testado, em um balão volumétrico esterilizado de 1L.



**Figura 13.** Fluxograma das atividades desenvolvidas no Teste de Dissimilação.

As diluições foram distribuídas em três frascos Winkler, mantidos em estufa de DBO, sem iluminação, com temperatura de  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ . O teor de oxigênio foi medido em todos os frascos, antes e depois da exposição de 24h.

O CBO foi determinado da seguinte forma:

$$\text{CBO (mg/L)} = \text{O}_2 \text{ inicial (mg/L)} - \text{O}_2 \text{ final (mg/L)}$$

A taxa do CBO de uma dada concentração foi calculada pela seguinte equação:

$$D_{\text{CBO}} (\%) = \frac{(\text{CBO}_n - \text{CBO}_c) \times 100}{\text{CBO}_c}$$

Onde:

$D_{\text{CBO}} (\%)$  = Taxa de Consumo Bioquímico de Oxigênio

$\text{CBO}_n$  = CBO da concentração do meio a ser testado

$\text{CBO}_c$  = CBO do Controle.

O critério do Teste de Dissimilação é a inibição do CBO e consiste na comparação da concentração do meio a ser testado com o controle. Assim, valores negativos da taxa do CBO

( $D_{CBO}$ ) indicam inibição ou toxicidade da amostra. Valores positivos, estímulo dos processos de Dissimilação, que podem ocorrer em esgotos biodegradáveis não tóxicos e também nos casos onde o CBO no meio a ser testado supera um provável efeito tóxico.

Valores de inibição e aceleração do CBO até 10% são considerados CENO (concentração de efeito não observado). Nesta faixa torna-se difícil diferenciar entre efeitos tóxicos e casuais nos ensaios.

#### 4.2.2.5. Análise Estatística

As análises de regressão linearizada foram realizadas por meio do programa PASW Statistics 18.

#### 4.2.3. *Ceriodaphnia dubia*

As culturas de *C. dubia* (Fig. 14) utilizadas no trabalho foram cedidas pelo Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN, da Universidade de São Paulo – USP, e são cultivadas no laboratório de Toxicologia e Limnologia da UCS desde 2007.



**Figura 14.** *Ceriodaphnia dubia* Richard, 1894  
(Fonte: <http://denr.sd.gov/des/sw/wet.aspx>)

##### 4.2.3.1. Água de cultivo

A água de cultivo e diluição utilizada para testes e cultivos foi elaborada segundo a NBR 13373 (ABNT, 2005), sendo a dureza ajustada entre 40-48 mg/L  $CaCO_3$ . Após o ajuste

da dureza, a água permaneceu aerando para total diluição dos sais.

Os valores de pH e temperatura foram ajustados no momento da utilização da água, sendo o pH de 7,2 ( $\pm 0,1$ ) e temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . A condutividade foi aferida e manteve-se abaixo de  $160 \mu\text{S/cm}$ , e o oxigênio dissolvido (OD) ficou entre 5 e  $8,5 \text{ mg/L}$  (EPA, 2002b).

#### 4.2.3.2. Alimento

A alga verde unicelular *Pseudokirchneriella subcapitata* foi utilizada como alimento para *C. dubia*, na concentração de  $2 \times 10^5$  células/mL por organismo. A alga foi cultivada em meio L.C. Oligo, sob aeração e iluminação constantes, à intensidade luminosa de aproximadamente 2800 LUX e temperatura de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ .

Semanalmente, o estoque de algas foi renovado, conforme consta no item 4.2.1.2. A centrifugação foi repetida por três vezes a 2400rpm por 15min, ressuspensa em meio de cultivo de *C. dubia* e após, realizada a contagem em Câmara de Neubauer para verificação do número de células por mL.

Além da alga, os organismos receberam um complemento alimentar a base de ração de peixe, combinada com fermento biológico fermentado, com teor de sólidos em suspensão calculado em  $0,045 \text{ g/mL}$ .

O fornecimento de alimento ocorreu durante a manutenção, três vezes por semana.

#### 4.2.3.3. Manutenção dos cultivos

As culturas foram mantidas em incubadoras, com intensidade luminosa de 500 a 1000 LUX, com fotoperíodo de 16 horas de luz, sem aeração e à temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ .

O cultivo de *C. dubia* foi mantido em copos de becker com 500 mL de água de diluição e 25 indivíduos no início de cada lote (cultivo populacional). A manutenção dos cultivos foi realizada três vezes por semana (segundas, quartas e sextas-feiras), quando todos os organismos foram transferidos para um novo becker com água de cultivo e alimento.

A transferência dos organismos foi feita com o auxílio de uma pipeta de Pasteur com diâmetro grande suficiente para evitar o estresse ou até mesmo danos físicos aos organismos durante o manuseio.

Sempre foram mantidos dois cultivos com idades diferentes, de maneira a ter organismos de todas as idades, o que assegura a reciclagem dos cultivos. Às sextas-feiras, no momento da repicagem dos cultivos, a cultura mais antiga foi descartada, dando origem a uma

nova com indivíduos jovens.

Além dos cultivos populacionais, cultivos individuais foram mantidos para servir de fonte de neonatos para os testes de toxicidade crônica. Para este tipo de cultivo, foram utilizados copos de becker de 50 ml com volume final igual a 30 ml de água de diluição, com apenas um organismo em cada cultura. A manutenção desses cultivos foi realizada da mesma forma que os cultivos populacionais.

Todos os dados referentes à manutenção, tanto do cultivo populacional quanto do individual, foram registrados e mantidos em planilhas.

#### **4.2.3.4. Teste de sensibilidade**

O método consistiu em expor indivíduos jovens de *C. dubia* a cinco concentrações diferentes de Cloreto de Sódio (NaCl) – 1,0; 1,3; 1,6; 1,9 e 2,2 g/L – mais um controle, por um período de 48 horas, sem alimento e sem aeração. O teste foi realizado em copos de becker de 50mL contendo 10mL de solução, quatro réplicas para cada concentração e cinco indivíduos por becker.

Decorridas 48 horas, o teste foi finalizado e o número de indivíduos imóveis ou mortos foi contabilizado. Testes estatísticos foram realizados utilizando-se o Coeficiente de Spearman. Os valores obtidos no ensaio de sensibilidade devem estar compreendidos num intervalo de  $\pm 2$  desvios-padrão em relação aos valores médios anteriormente obtidos para a mesma espécie, o que corresponde à carta-controle (ABNT, 2005).

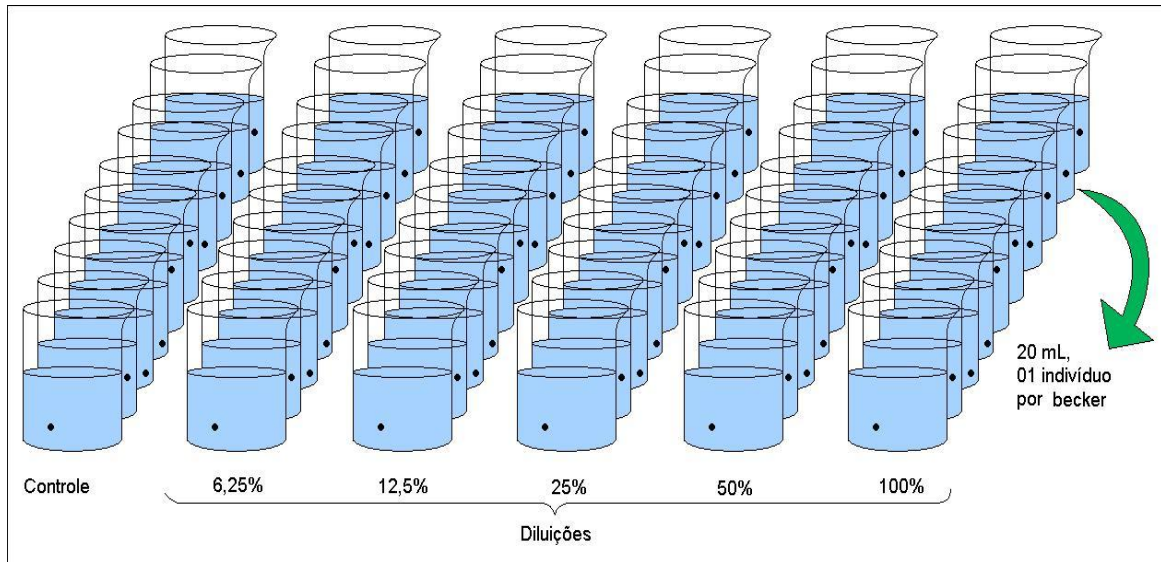
Esses testes foram efetuados mensalmente, e, a cada 20 testes de sensibilidade realizados, o valor-médio, o desvio-padrão e o coeficiente de variação foram recalculados.

Na carta-controle, a faixa de CE(I)50;48h (concentração efetiva inicial mediana, ou seja, a concentração da amostra que causa efeito agudo a 50% dos organismos em 48h) variou entre 1,12 e 2,12 g/L NaCl. O valor médio obtido foi de 1,66 g/L NaCl (Anexo 2).

#### **4.2.3.5. Avaliação dos Resultados**

A avaliação da toxicidade crônica para *C. dubia* baseou-se na ABNT (2005) e EPA (2002b).

Os ensaios foram realizados em copos de becker de 50 mL com volume final de 20 mL das soluções testadas. Foram preparadas cinco concentrações: 6,25%, 12,5%, 25%, 50% e 100%. Para cada diluição foram feitas 10 réplicas, sendo um organismo por réplica (Fig. 15).



**Figura 15.** Esquema do ensaio de toxicidade crônica com *Ceriodaphnia dubia*.

A transferência dos organismos foi feita de forma aleatória, e o teste mantido a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  por um período de sete dias. O teste foi prorrogado para o oitavo dia caso 60% das fêmeas não tenham chegado à terceira postura ou, quando ao final de sete dias, o controle não tenha atingido a média de 15 neonatos por fêmea. O fotoperíodo foi de 16 horas de luz com intensidade luminosa de 500 a 1000 LUX, sem aeração, e com alimentação diária. Os copos de becker foram cobertos por filme plástico de PVC, para evitar possíveis interferências. A validação do ensaio dependeu dos parâmetros do controle: mortalidade inferior a 20% e reprodução média maior ou igual a 15 neonatos/fêmea.

A manutenção dos organismos foi feita a cada dois dias, quando todos os procedimentos de diluição, montagem e alimentação foram repetidos. A cada manutenção, os jovens foram contados, registrados e descartados, e os organismos testados foram transferidos para os novos meios preparados. Foram analisados e registrados os parâmetros físico-químicos (pH, oxigênio dissolvido – OD, e condutividade) iniciais e finais de todas as concentrações a cada manutenção do teste.

O sistema utilizado para este teste é semi-estático. Através dos dados de mortalidade e fecundidade foi possível determinar o CENO (maior concentração real da amostra que não



causa efeito deletério estatisticamente significativo na sobrevivência e reprodução dos organismos nas condições de ensaio) e o CEO (menor concentração real da amostra que causa efeito deletério estatisticamente significativo na sobrevivência e reprodução dos organismos nas condições de ensaio), que foram utilizados para determinar os níveis de toxicidade da amostra. Para cálculo de CENO e CEO, utilizou-se o software TOXSTAT versão 3.5, com nível de significância  $\alpha = 0,05$ .

#### 4.2.4. *Caenorhabditis elegans*

*C. elegans*, linhagem N2 tipo selvagem (Fig. 16), foi adquirido do Genetics Center, em Minneapolis, EUA, para que o histórico, idade e qualidade dos organismos fossem conhecidos.



**Figura 16.** *Caenorhabditis elegans* Maupas, 1900.  
(Foto: Elias Z. Michalski)

##### 4.2.4.1. Condições de cultivo

Todos os procedimentos de manutenção e ensaio com *C. elegans* basearam-se na norma ISO/DIS 10872 (2009).

No laboratório, esses organismos foram mantidos a 20°C em placas de Petri com ágar, tendo *Escherichia coli* (linhagem OP50) como alimento. As placas de estoque foram renovadas mensalmente.

O estoque de bactérias foi renovado a cada seis meses e mantido congelado em tubos eppendorf com volume final de 100µL. A solução de BAC e a curva de calibração também foram refeitas semestralmente.

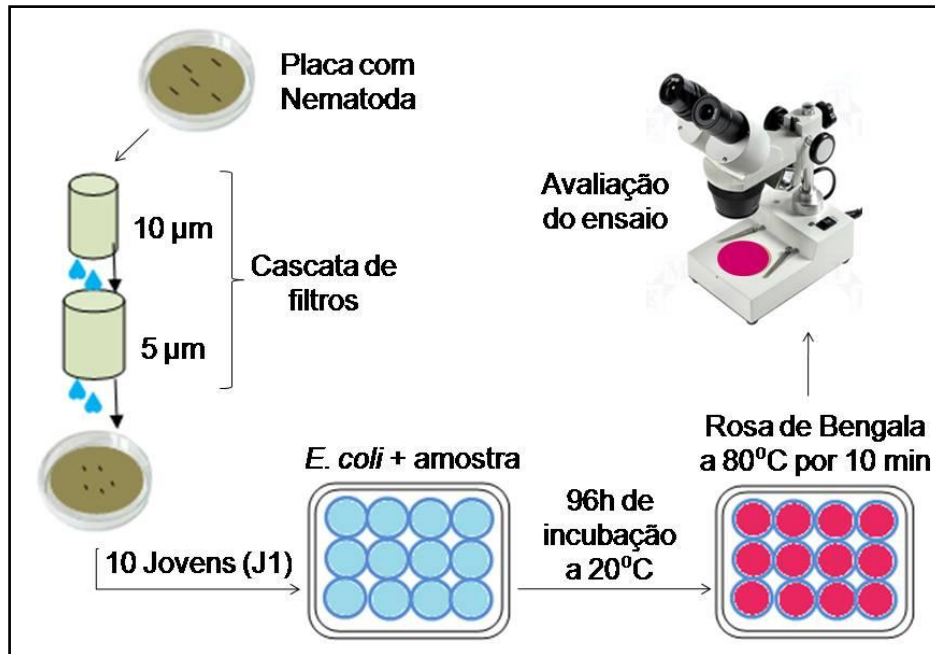
#### 4.2.4.2. Procedimento do ensaio

Os parâmetros avaliados no teste foram crescimento e reprodução.

No ensaio com o lote 1 utilizou-se a série de diluições sugeridas pela norma ISO/DIS 10872 (2009) (10%, 20%, 40% e 50%). Entretanto, para facilitar as comparações, os demais lotes (7, 8, 9 e 10) foram testados com as mesmas diluições empregadas nos ensaios com os outros organismos (12,5%, 25% e 50%). A diluição de 6,25% não foi avaliada, visto que a menor diluição sugerida pela norma é de 10%. Foram feitas seis réplicas para cada diluição. Concomitantemente, foi realizado um teste de sensibilidade com o mesmo número de concentrações e réplicas, onde se utilizou a solução BAC (cloreto de benzalcônio) como substância de referência, além do controle, feito com água destilada.

No procedimento, foi colocada nas placas multicélulas 0,5 mL da solução-teste e 0,5 mL de suspensão de *E. coli* em meio M9. Em cada um das seis replicatas, foram colocados dez organismos hermafroditas em estágio J1 (cerca de 270µm), previamente separados em estereomicroscópio com auxílio de uma pipeta capilar. Essas placas foram incubadas em estufa BOD por 96 horas a 20°C. Foram medidos 30 jovens em estágio J1 para obter o comprimento inicial dos organismos-teste introduzidos. O valor utilizado para os cálculos foi a média do comprimento desses 30 jovens. Ao final do teste, os organismos foram corados com solução de Rosa de Bengala e mortos em estufa a 80°C por 10 minutos. Os organismos adultos foram retirados, contados e medidos (Fig. 17). A avaliação dos resultados foi feita pela medida do comprimento dos nematódeos adultos em microscópio (aumento 40x) e pela contagem do número total de organismos juvenis (2ª geração).

O crescimento dos organismos adultos foi calculado pela diferença entre a média do comprimento dos 30 jovens em estado J1 e o tamanho dos nematódeos ao final do ensaio.



**Figura 17.** Esquema do ensaio de toxicidade crônica com *Caenorhabditis elegans* (adaptado de FOMIN *et al.*, 2003).

#### 4.2.4.3. Validação dos resultados

O ensaio foi considerado válido quando: a mortalidade dos indivíduos adultos foi  $\leq 20\%$ ; a reprodução média no controle foi superior a 30 neonatos por organismo e o crescimento dos organismos em substância de referência (BAC) foi de 20 a 80% inferior em relação ao controle.

#### 4.2.4.4. Teste de Sensibilidade

De acordo com a norma ISO/DIS 10872 (2009), a taxa de inibição do crescimento dos organismos na presença da substância de referência deve ser de 20 a 80% em relação ao controle. Na carta-controle realizada durante esse estudo, a taxa de inibição variou entre 20 e 56% e o valor médio obtido foi 33%, o que tornou os ensaios válidos.

#### 4.2.4.5. Avaliação dos resultados

Os resultados foram apresentados em porcentagem de inibição em relação ao controle (ISO/DIS 10872, 2009).

$$\text{Taxa de inibição} = 100 - (\text{Amostra/Controle}) \times 100$$

A análise estatística ( $p < 0,05$ ) foi feita por meio de análise de variância (ANOVA) com comparação múltipla segundo Tukey, com o auxílio do programa PASW Statistics 18.

### 4.3. ANÁLISE DA SENSIBILIDADE DOS ENSAIOS

A avaliação dos resultados foi realizada mediante a comparação entre ensaios agudos e crônicos. Foram comparados os resultados dos ensaios agudos entre si, realizados com os lotes 3 a 6 de efluente tratado, e dos ensaios crônicos entre si, com os lotes 1 a 5. Para realizar a comparação simultânea entre os quatro ensaios, foram usados os lotes 3 a 5, pois nesses foi realizada toda a bateria de testes.

**Tabela 2.** Classes de toxicidade segundo Krebs (2005) e níveis de sensibilidade dos organismos.

Nível de diluição mais elevado sem efeito	Potencial de toxicidade	Classes de toxicidade	Níveis de Sensibilidade
100%	0	Toxicidade não detectada	Toxicidade não detectada
50%	1	Muito pouco tóxica	Baixa
25%	2	Levemente tóxica	
12,5%	3	Moderadamente tóxica	Moderada
6,25%	4	Notavelmente tóxica	
3,12%	5	Altamente tóxica	Alta
$\leq 1,56\%$	$\geq 6$	Extremamente tóxica	

A sensibilidade dos diferentes organismos foi avaliada pelo CEO e classificada conforme a Tabela 2. A designação das cores foi adaptada do método pT (potencial de toxicidade) para sedimento, proposto por Krebs (2005).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. ENSAIOS DE TOXICIDADE AGUDA

A comparação entre os ensaios agudos foi realizada com os lotes 3 a 6 de efluente tratado, totalizando quatro ensaios.

#### 5.1.1. *Daphnia magna*

Nos ensaios realizados com *D. magna*, não foi constatada diferença significativa em relação ao controle em nenhuma das diluições nos quatro lotes de efluente tratado ( $\alpha = 0,05$ ), conforme mostra a Tabela 3. Portanto, o efluente não apresentou efeito sobre a mortalidade de *D. magna*.

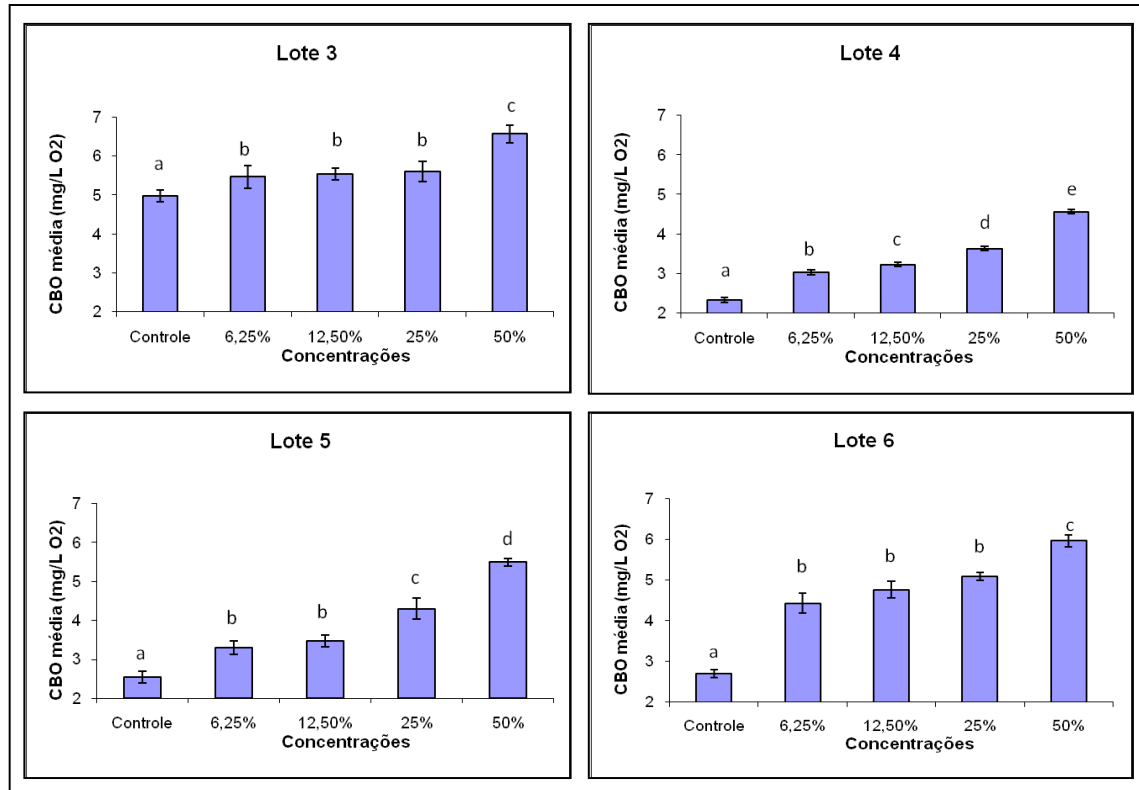
**Tabela 3.** Mortalidade de *D. magna* ao final dos ensaios agudos (n=20) com efluente tratado de refinaria de petróleo.

	Efluente tratado			
	Lote 3	Lote 4	Lote 5	Lote 6
<b>Controle</b>	0	0	2	0
<b>6,25%</b>	0	0	0	0
<b>12,50%</b>	0	0	0	0
<b>25%</b>	0	0	0	0
<b>50%</b>	0	0	0	0
<b>100%</b>	0	0	0	0

#### 5.1.2. Testes de Dissimilação

Os valores de CBO no controle variaram entre 2,33 e 4,97 mg/L O<sub>2</sub> em 24 horas (Fig. 18). Esses valores foram utilizados como referência para calcular a taxa de estímulo ou inibição.

Os resultados dos testes realizados com os quatro lotes de efluente tratado mostraram a mesma tendência (Fig. 18). Todos os ensaios apresentaram diferenças significativas em relação ao controle a partir das menores concentrações, com aumento progressivo (dose-resposta) da CBO média verificada em todas as amostras testadas. Esse estímulo foi mais acentuado nos lotes 3 e 6 do efluente.



**Figura 18.** Média e desvio padrão da CBO nos Testes de Dissimilação realizados com efluente tratado de refinaria de petróleo. Letras diferentes indicam concentrações que diferem significativamente entre si.

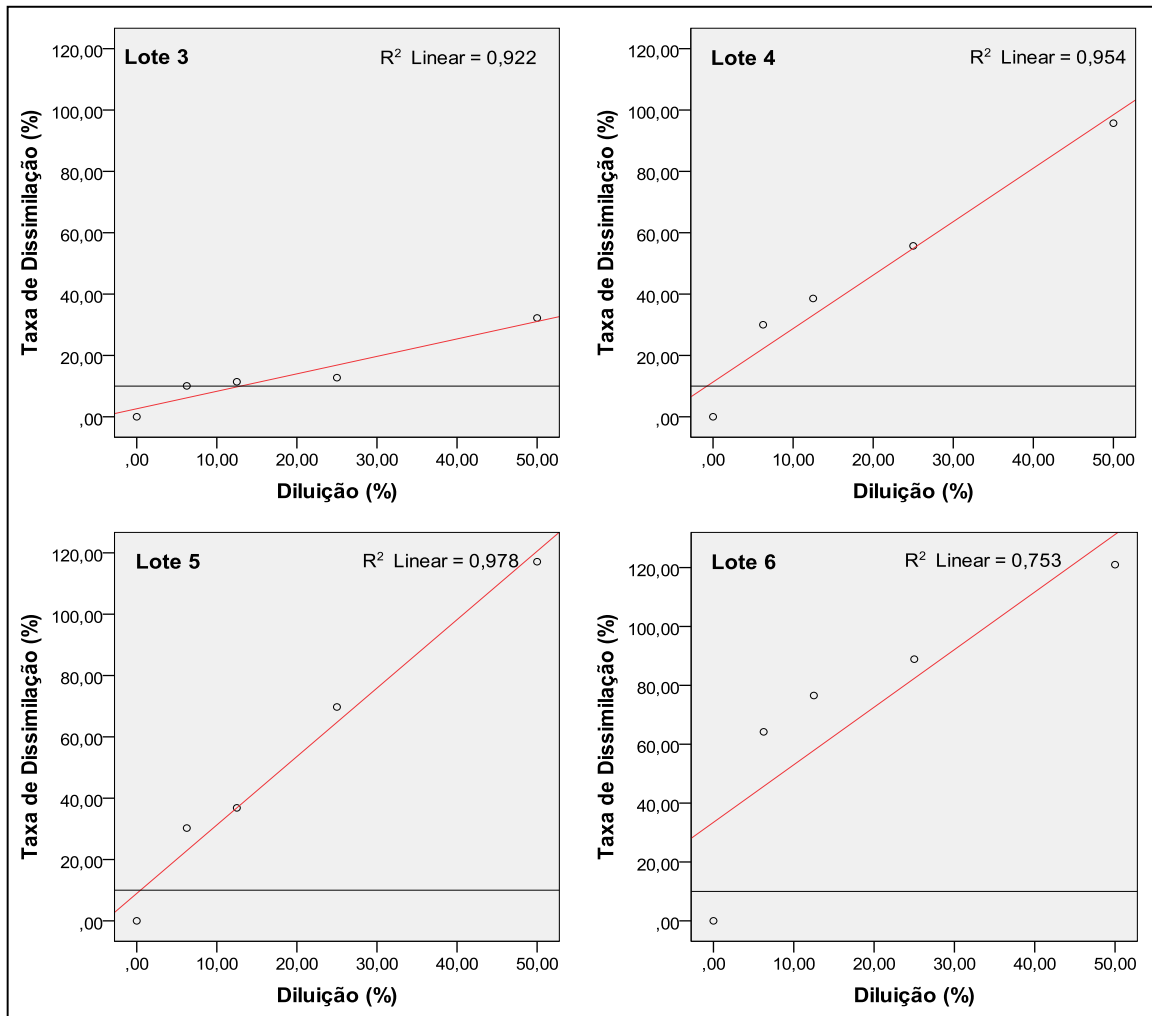
Os resultados que expressam a taxa de dissimilação (%) podem ser observados na Figura 19. Os valores são mostrados na Tabela 4.

**Tabela 4.** Taxas de dissimilação obtidas nos ensaios com o Teste D em efluente tratado de refinaria de petróleo.

Lote	Controle	6,25%	12,50%	25%	50%
3	0,00	10,07%	11,41%	12,75%	32,21%
4	0,00	30,00%	38,57%	55,71%	95,71%
5	0,00	30,26%	36,84%	69,74%	117,11%
6	0,00	64,20%	76,54%	88,89%	120,99%

Em todos os lotes, a intensidade do consumo de oxigênio pelas bactérias mostrou-se relacionada com as diluições da amostra. Foi verificado aumento no consumo de oxigênio diretamente relacionado com as concentrações (Figs. 18 e 19). Os valores mais significativos foram superiores a 95% da variância do estímulo explicada pela concentração (lotes 4 e 5).

Não foi observado nenhum efeito de inibição da taxa de decomposição de peptona.



**Figura 19.** Relação entre a taxa de dissimilação e a concentração das amostras no Teste D. A linha horizontal representa 10% de estímulo.

### 5.1.3. Comparação entre os Ensaios de Toxicidade Aguda

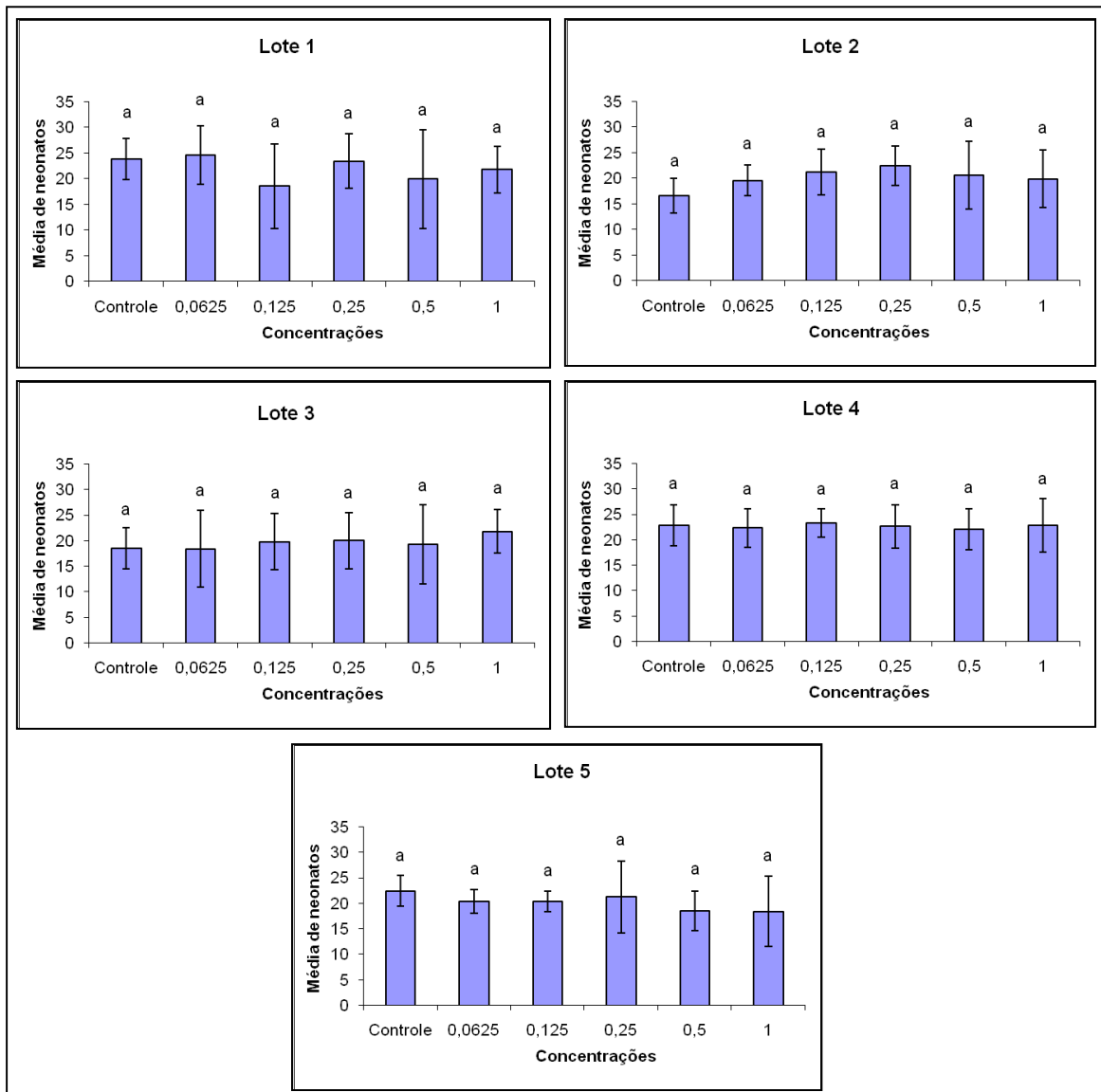
Nas amostras de efluente tratado, não foram constatadas divergências nas respostas dos ensaios com *D. magna* e o Teste D. Não foi detectada toxicidade aguda em nenhuma concentração em todas as amostras avaliadas.

## 5.2. ENSAIOS DE TOXICIDADE CRÔNICA

Os ensaios de toxicidade crônica para fins de comparação foram realizados com os lotes 1 a 5 de efluente tratado, totalizando cinco testes para cada organismo.

### 5.2.1. *Ceriodaphnia dubia*

Os resultados referentes à reprodução de *C. dubia* obtidos nos ensaios com efluente tratado de refinaria de petróleo são mostrados na Figura 20. Não foram verificadas diferenças significativas em relação ao controle em nenhuma das diluições avaliadas.



**Figura 20.** Média e desvio padrão da reprodução de *Ceriodaphnia dubia* (número de neonatos/fêmea) nos ensaios de toxicidade crônica com efluente tratado de refinaria de petróleo. Letras diferentes indicam concentrações que diferem significativamente entre si.

Os resultados referentes à mortalidade, da mesma forma que a reprodução, não apresentaram diferenças significativas em relação ao controle. Portanto, o efluente tratado não apresentou toxicidade crônica para *C. dubia*.

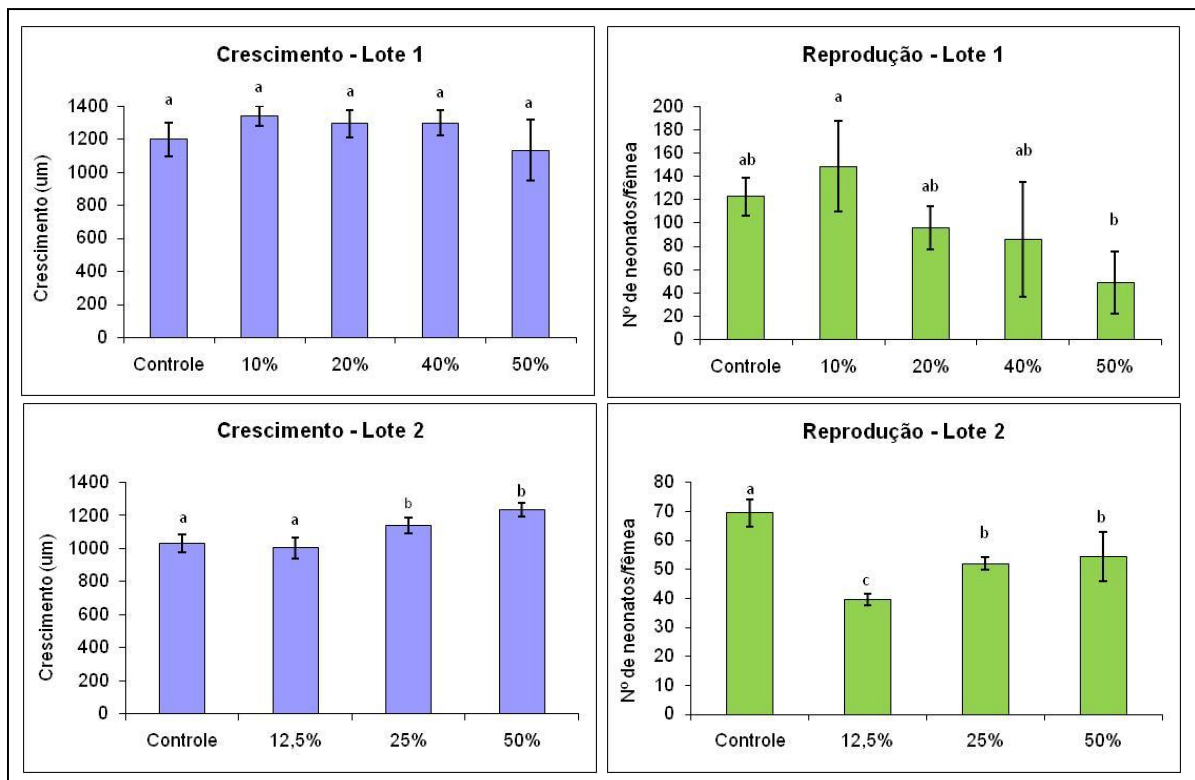


### 5.2.2. *Caenorhabditis elegans*

Os resultados dos ensaios realizados com *C. elegans* são mostrados nas Figuras 21 a 23. A toxicidade foi apresentada pelo cálculo das taxas de inibição da reprodução e do crescimento, conforme sugere a norma, e pela análise estatística.

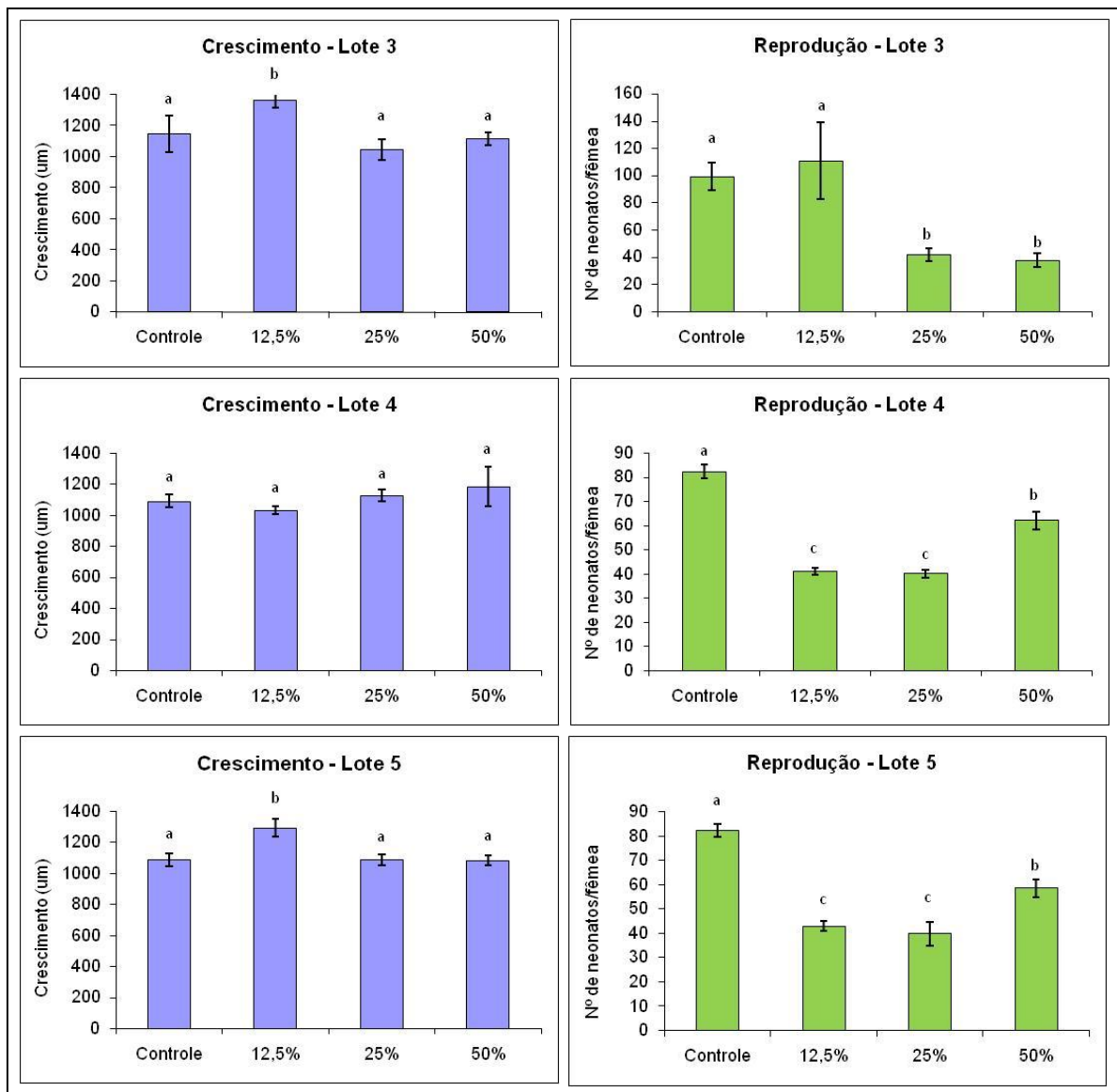
As respostas obtidas nos ensaios com *C. elegans* foram bastante distintas para as diferentes amostras de efluente tratado de refinaria.

De modo geral, comparando-se os resultados obtidos entre a reprodução e o crescimento de *C. elegans*, pode-se verificar que a reprodução foi o parâmetro mais sensível e mais vulnerável à ação do efluente tratado. Nos lotes 2, 4 e 5 houve inibição da reprodução em todas as concentrações da amostra (Figs. 21 e 22).



**Figura 21.** Média e desvio padrão do crescimento e da reprodução de *Caenorhabditis elegans* nos ensaios com os lotes 1 e 2 de efluente tratado de refinaria de petróleo. Letras diferentes indicam concentrações que diferem significativamente entre si.

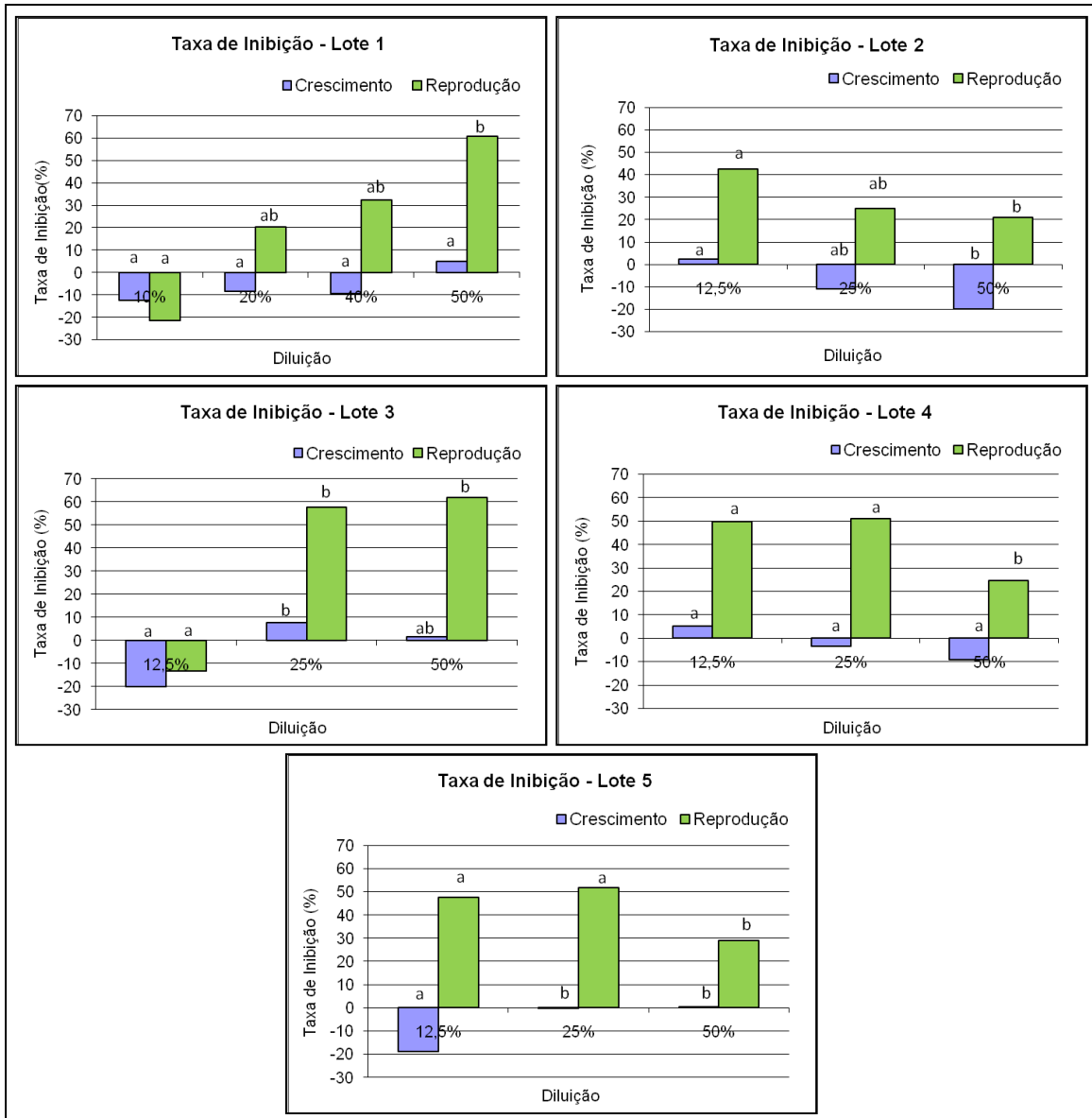
O crescimento de *C. elegans* foi pouco afetado na exposição ao efluente tratado. Os nematódeos mostraram maior crescimento na concentração mais baixa quando expostos aos lotes 1, 3 e 5.



**Figura 22.** Média e desvio padrão do crescimento e da reprodução de *Caenorhabditis elegans* nos ensaios com os lotes 3 a 5 de efluente tratado de refinaria de petróleo. Letras diferentes indicam concentrações que diferem significativamente entre si.

Foi observado o efeito de hormese, onde ocorreu estímulo da reprodução e/ou do crescimento na menor concentração da amostra (Fig. 23). No lote 3, especificamente, o efeito de hormese foi verificado nos dois parâmetros avaliados: crescimento e reprodução. A diferença constatada foi significativamente comprovada somente para o crescimento.

A taxa de inibição comprovou o nítido efeito do efluente sobre a reprodução (Fig. 23).



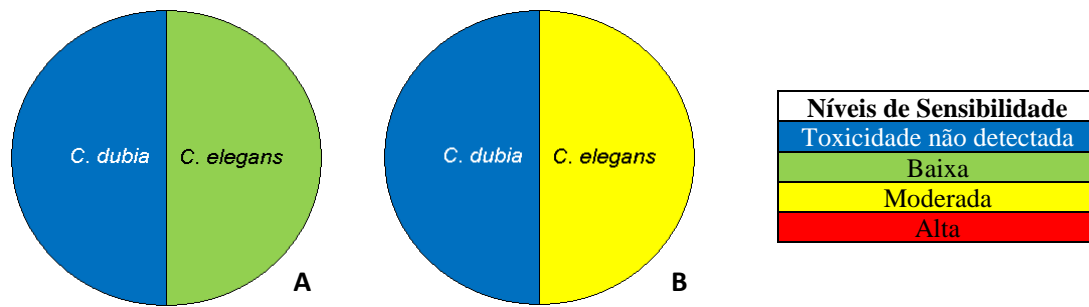
**Figura 23.** Taxas de inibição do crescimento e da reprodução de *Caenorhabditis elegans* nos ensaios com efluente tratado de refinaria de petróleo. Letras diferentes indicam concentrações que diferem significativamente entre si.

A inibição da reprodução esteve associada a um estímulo do crescimento, em alguns casos, a exemplo das concentrações de 25% e 50% dos lotes 2 e 4 (Fig. 23).

### 5.2.3. Comparação entre os Ensaios de Toxicidade Crônica

Para comparação dos ensaios crônicos foi avaliada a reprodução de *C. dubia* e de *C. elegans*.

A avaliação dos resultados obtidos com as amostras de efluente tratado de refinaria de petróleo (lotes 1 a 5) mostrou diferenças entre as respostas dos dois organismos (Fig. 24).



**Figura 24.** Classificação da sensibilidade de *Ceriodaphnia dubia* e *Caenorhabditis elegans* testados com efluente de refinaria de petróleo, conforme Tabela 3. A) Avaliação do lote 1; B) Avaliação dos lotes 2, 3, 4 e 5.

Em todos os lotes de efluente tratado avaliados, *C. dubia* apresentou CENO de 100%, o que indica que não foi detectada toxicidade para esse organismo.

Os testes com *C. elegans* identificaram níveis de toxicidade que variaram de muito pouco tóxico (CEO de 50%) a moderadamente tóxico (CEO de 12,5%), sendo este classificado como um organismo de sensibilidade baixa a moderada. Sendo assim, o nematódeo mostrou-se mais eficiente na detecção de toxicidade crônica em comparação à *C. dubia* para o efluente testado.

## 6. DISCUSSÃO

Efluentes de refinarias de petróleo apresentam os mesmos constituintes tóxicos e de difícil degradação que o petróleo e seus derivados. São considerados resíduos de alto risco ao meio ambiente, necessitando tratamento complexo antes de serem lançados no sistema receptor (RUBINGER, 2009).

Os sais contidos nos efluentes de refino constituem a chamada “poluição salina” (MARIANO, 2001) e sua toxicidade aos organismos aquáticos pode variar de baixa, como no caso dos cloretos, até alta, como nos cianetos, e a principal consequência da presença de tais substâncias no meio aquático é a eliminação de algumas espécies (GURGEL *et al.*, 2009).

O desconhecimento da composição química de efluentes é uma situação comum em muitos despejos, e para tais amostras a abordagem baseada na toxicidade é geralmente reconhecida como o melhor método para determinar o potencial de toxicidade (PANDARD *et al.*, 2006). Não há unanimidade sobre qual seria o melhor tipo de organismo-teste para determinado efluente e nem qual conjunto de testes deveria ser utilizado para assegurar que os componentes e subprodutos da degradação de efluentes causem o menor impacto possível aos ecossistemas aquáticos (RUBINGER, 2009).

Pandard *et al.* (2006) afirmam que ensaios multi-espécie são necessários para a seleção do grupo ideal de organismos-teste para tipos específicos de resíduo. Esses ensaios permitem avaliar diferentes níveis de organização biológica, além de efeitos sinérgicos, antagonísticos e transferências de compostos, que podem ter respostas distintas nos diferentes organismos testados. Ensaios multi-espécie buscam uma situação mais próxima da realidade, a fim de que os resultados obtidos possam espelhar com maior exatidão os possíveis riscos provenientes do despejo de efluentes em corpos receptores (GUIMARÃES *et al.*, 2003).

Nesse estudo, a avaliação da toxicidade aguda e crônica do efluente tratado de refinaria foi feita utilizando duas espécies de microcrustáceos, amplamente empregados em ensaios de toxicidade, e dois ensaios menos conhecidos para esse tipo de análise: o Teste D e os ensaios com *C. elegans*.

Os ensaios com *D. magna* não detectaram toxicidade aguda para o efluente de refinaria avaliado. Resultado semelhante foi encontrado por Damato *et al.* (1998), usando *D. similis* na avaliação da toxicidade aguda de efluente final de refinaria de petróleo. De acordo com os autores, esses dados concordam com os de diversas refinarias norte-americanas e canadenses, onde dificilmente é verificada toxicidade aguda para esse tipo de efluente.

O Teste D não identificou toxicidade aguda em nenhuma das amostras avaliadas,

concordando com o observado para *D. magna*. Por outro lado, foi evidenciado estímulo no consumo de oxigênio pelas bactérias no Teste D em todos os ensaios realizados. Quando a amostra contém matéria orgânica em sua composição, como é o caso do tipo de efluente testado (DAMATO & SOBRINHO, 1996), a tendência do ensaio é mostrar um estímulo na atividade bacteriana devido às semelhanças entre essas substâncias orgânicas e a peptona utilizada na “alimentação” dos cultivos. Segundo Fontanella (2007), em águas mais poluídas, avaliadas como classes III e IV pela Resolução nº 357/05 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA, 2005), há dificuldade na interpretação dos resultados do Teste D em função da alta DBO da água testada. A aplicabilidade do Teste D em águas poluídas por esgotos cloacais e industriais deve considerar essa limitação.

Segundo Thibault & Tracy (1978), choques causados por sulfetos são caracterizados por uma rápida diminuição do crescimento microbiano seguida de um aumento na taxa de utilização de oxigênio. O sulfeto, geralmente presente em efluentes de refinaria de petróleo (MARIANO, 2001), poderia, junto com a matéria orgânica, ser responsável pelo estímulo no metabolismo das bactérias no Teste D.

Inibição na atividade bacteriana é, geralmente, evidenciada no Teste D quando metais pesados estão presentes na amostra (KREBS, 1985). Os efluentes de refinaria de petróleo podem conter, entre outros compostos, uma ampla gama de poluentes orgânicos e metálicos, incluindo metais pesados (HOSHINA & MARIN-MORALES, 2010). Uma das principais formas de ação desses compostos é a sua combinação com proteínas do sistema enzimático dos microrganismos, provocando a inativação das mesmas e, assim, impossibilitando o seu metabolismo normal (TSUKAMOTO *et al.*, 2004). A ausência de inibição poderia sugerir que os processos responsáveis pela eliminação de compostos metálicos em efluentes de refinaria, como a desmineralização, a eletrodialise e a eletrodeionização (COLLARES, 2004), foram eficientes na redução da disponibilidade de metais.

Testes de toxicidade aguda, em geral, apresentam diversas limitações. De acordo com Magalhães & Ferrão Filho (2008), não há como avaliar de que maneira a mortalidade aumentará após a exposição, pois o efeito adverso só aparece depois de um período de latência, e o curto tempo de exposição empregado nos ensaios agudos pode não abranger este período. Além disso, esse tipo de ensaio não avalia os efeitos subletais que podem levar à morte por exposição prolongada. Dessa forma, o fato de não ter sido verificada toxicidade aguda no efluente testado não significa que ele esteja livre de compostos tóxicos.

As concentrações subletais de produtos tóxicos no ambiente aquático podem causar

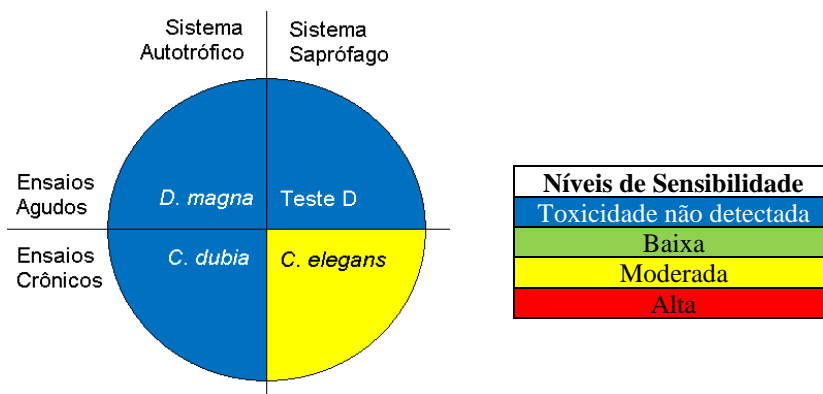
uma série de efeitos que não provocam a morte imediata dos organismos, mas que representam perturbações importantes, consideradas como “morte ecológica”, impossibilitando ao organismo efetuar suas funções no ecossistema e podendo levar à morte (MAGALHÃES & FERRÃO FILHO, 2008). A eliminação de espécies pode ocorrer mesmo quando substâncias tóxicas estejam presentes em baixas concentrações no ambiente, o que se traduz pela toxicidade crônica, que é a resposta a um estímulo contínuo que afeta, principalmente, a reprodução e o crescimento dos organismos (RAND & PETROCELLI, 1985).

Os ensaios com *C. dubia* não evidenciaram toxicidade crônica no efluente de refinaria. Damato & Sobrinho (1996) afirmam, a partir de dados obtidos de refinarias canadenses, que dificilmente é constatada a presença de toxicidade crônica para *C. dubia* em plantas industriais de refinaria de petróleo que possuam sistema de lodos ativados, o que concorda com os resultados obtidos no presente estudo. Por outro lado, Hartmann (2004) verificou toxicidade crônica para *C. dubia* (CENO de 25 a 50%) em sete das dez amostras de efluente de indústria petroquímica, mesmo com 85,7% dos parâmetros físicos e químicos analisados estando de acordo com os limites de lançamento de efluentes em corpos receptores. Da mesma forma, Damato & Sobrinho (1996) verificaram toxicidade em cinco das nove amostras de refinaria avaliadas no estado de São Paulo, sendo que o CENO variou entre 30 e 60%. Chapman *et al.* (1990) e Sherry *et al.* (1994) determinaram a toxicidade crônica de efluentes de duas refinarias de petróleo para *C. dubia* e *P. promelas*, constatando que o microcrustáceo foi mais sensível que a espécie de peixe. A expressão da quantidade de poluentes gerados por quantidade de petróleo processado não pode ser generalizada para diferentes refinarias (MARIANO, 2001), assim como não é possível generalizar a composição dos efluentes de refino, visto que cada petróleo possui características únicas (RUBINGER, 2009), o que pode explicar a amplitude de respostas encontradas.

Embora o efluente analisado não tenha apresentado efeito tóxico sobre *C. dubia*, foi evidenciada toxicidade crônica nos ensaios com *C. elegans*. O Nematoda *C. elegans* é considerado um organismo modelo para detecção de estresse genotóxico (MACQUEEN & VILLENEUVE, 2001; BOULTON *et al.*, 2002, RINALDO *et al.*, 2002; GARTNERT *et al.*, 2004) e tem sido largamente utilizado para avaliação da toxicidade de solos, sedimentos e água intersticial (DONKIN & DUSENBERRY, 1993; BARDGETT *et al.*, 1994; HÖSS *et al.*, 1997; TRAUNSPURGER *et al.*, 1997; BOYD *et al.*, 2000; FREEMAN *et al.*, 2000; GERHARDT *et al.*, 2002; BOYD & WILLIAMS, 2003; ANDERSON *et al.*, 2004; SOCHOVÁ *et al.*, 2006). Porém, no monitoramento da toxicidade aquática ou de efluentes,

ainda é pouco empregado. Esse resultado pode estar relacionado aos hábitos alimentares de *C. elegans*, que encontra grande disponibilidade de alimento no efluente testado.

Segundo Rubinger (2009), por serem ensaios há mais tempo padronizados e internacionalmente descritos, os testes que utilizam cladóceros estão amplamente difundidos nas pesquisas e nas regulamentações que visam à análise de toxicidade de efluentes e substâncias químicas complexas. Por esse motivo, *D. magna* e *C. dubia* são organismos comumente utilizados em ensaios de toxicidade aguda e crônica para distintos compostos e no monitoramento de efluentes industriais (BRENTANO & LOBO, 2004; HENRY *et al.*, 2004; PANDARD *et al.*, 2006; DALLA COLLETTA, 2008; OLIVEIRA-FILHO *et al.*, 2008; PUSCEDDU, 2009). Porém, a comparação da sensibilidade dos organismos (Fig. 25) evidencia que as espécies rotineiramente utilizadas na detecção de toxicidade apresentaram baixa sensibilidade ao efluente tratado de refinaria de petróleo e que, dentre os organismos estudados, *C. elegans* mostrou-se mais adequado para a avaliação desse tipo de efluente. Segundo Arenzon (2004) a variabilidade dos efeitos tóxicos pode estar relacionada com as diferenças na sensibilidade dos organismos, a complexidade dos compostos presentes nas amostras, a biodisponibilidade de certas substâncias ou pode ser decorrente da presença de substâncias que não foram analisadas.



**Figura 25.** Comparação da sensibilidade dos organismos ao efluente de refinaria de petróleo, conforme Tabela 2.

*C. elegans* tem sido referido como um consumidor primário na cadeia trófica (HÖSS *et al.*, 2010; TRAUNSPURGER *et al.*, 1997) que tem como base os organismos autotróficos. Porém, *C. elegans* é um habitante do solo, sendo assim, integrante do sistema saprófago (Fig. 3), devendo ser considerado um microbívoro (DAJOZ, 2005). Dessa forma, no estudo realizado, foram utilizados consumidores primários (*D. magna* e *C. dubia*) e dois



representantes do sistema saprófago: *C. elegans* e a cultura mista de bactérias utilizada para o Teste D.

Nos ensaios com *C. elegans* foi verificado que, muitas vezes, a inibição da reprodução esteve associada a um estímulo do crescimento, o que pode caracterizar um efeito endócrino que não pode ser comprovado pelo ensaio realizado.

Bactérias do gênero *Pseudomonas* são citadas entre as principais bactérias heterótrofas presentes em sistema de lodos ativados (MENDONÇA, 2002). Diversas linhagens de *Pseudomonas* podem matar *C. elegans* em poucas horas (TAN *et al.*, 1999; KURZ & EWBANK, 2000). No entanto, o crescimento dos nematódeos não apresentou diferença significativa em relação ao controle, evidenciando que a possível presença de *Pseudomonas* não interferiu nos resultados do ensaio.

Foi observado, nos ensaios com *C. elegans*, estímulo nas menores concentrações testadas. Essa resposta pode estar relacionada ao nível trófico que ocupam esses organismos e ao composto de origem do efluente, o petróleo, que se caracteriza como um sistema saprófago.

O efeito de estímulo nas menores concentrações é conhecido como hormese e caracteriza-se por ser um fenômeno de resposta binária, produzindo, em baixa dose, reações opostas às obtidas em altas concentrações (CALABRESE, 2009). Diversos estudos têm comprovado o efeito estimulatório em baixas concentrações a partir de diferentes sistemas de teste (CALABRESE & BLAIN, 2005; BOEKELHEIDE, 2007). No caso de efluentes em geral, que são misturas complexas de substâncias químicas, torna-se difícil prever os valores-limite referentes a resposta hormética (BELZ *et al.*, 2008). Esse tipo de resposta não é prevista pelas normas técnicas e legislações em vigor, onde uma amostra é considerada tóxica quando há inibição dos parâmetros avaliados (sobrevivência, reprodução, crescimento, etc.). Georgetti *et al.* (2008) afirmam que o efeito da hormese pode ser ignorado, pois não é considerado adverso. Por outro lado, Belz *et al.* (2008) mostram que a hormese é substancial e relevante nos estudos da toxicidade de misturas. Chapman (2002) constata a importância desse fenômeno como um componente-chave para a avaliação do risco ambiental.

Toda alteração na composição e estrutura de comunidades tende a interferir na organização do ecossistema como um todo. Sendo assim, respostas distintas àquelas geralmente avaliadas em ensaios ecotoxicológicos, como é o caso da hormese, deveriam ser incluídas na determinação da toxicidade de amostras, proporcionando maior proteção aos ecossistemas.

## 7. CONCLUSÕES

A análise dos dados obtidos nesse trabalho permite concluir que:

- Os organismos rotineiramente utilizados (*D. magna* e *C. dubia*) se mostraram menos sensíveis, o que confirma a necessidade de utilizar ensaios mais adequados para a avaliação de toxicidade de efluentes de refinaria de petróleo;
- A reprodução de *C. elegans* foi o parâmetro mais adequado na detecção da toxicidade para este tipo de efluente;
- O ensaio de toxicidade crônica com *C. elegans* pode integrar o sistema de testes para monitoramento de efluentes da indústria petroquímica;
- Efeitos de estímulo, observados nos representantes do sistema saprófago, enfatizam a importância de incluir essa resposta nas interpretações ecotoxicológicas, a fim de possibilitar uma avaliação mais precisa dos efeitos deletérios aos ecossistemas.

## 8. REFERÊNCIAS

- ABESSA, D.M.S. (2002). Avaliação da qualidade de sedimentos do Sistema Estuarino de Santos, SP, Brasil. **Tese de Doutorado**. Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo. São Paulo, Brasil. 290p.
- ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR-12713. (2004). *Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com Daphnia spp (Cladocera, Crustacea)*. Rio de Janeiro. 21p.
- ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR-13373. (2005). *Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica – Método de Ensaio com Ceriodaphnia spp (Crustácea, Cladocera)*. Rio de Janeiro. 15p.
- ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR-15411-1. (2006). *Ecotoxicologia aquática – Determinação do efeito inibitório de amostras de água sobre a emissão de luz de Vibrio fischeri (Ensaio de bactéria luminescente) - Parte 1: Método utilizando bactérias recém-cultivadas*. Rio de Janeiro. 18p.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K & WATSON, J.D. (2004). **Biologia Molecular da Célula**. 4 ed. New York: Garland Science. 1725p.
- ANDERSON, G.L.; COLE, R.D. & WILLIAMS, P.L. (2004). Assessing behavioral toxicity with *Caenorhabditis elegans*. **Environmental Toxicology and Chemistry**. 23: 1235-1240.
- ARAÚJO, B.C.S.; SILVA, J.M.B.; WADA, R. & OLIVEIRA-FILHO, S.R. (2008). Tratamento de efluentes industriais. *Revista Ciência do Ambiente On-Line*. 4(2): 1-5.
- ARENZON, A. (2004). Ensaio ecotoxicológicos no monitoramento da qualidade de águas subterrâneas potencialmente impactadas. **Tese de Doutorado**. Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Brasil. 112p.
- AZEVEDO, F.A. & CHASIN, A.A.M. (2004). **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. São Carlos: RiMa, 340p.
- BAPTISTA, I.E.; SOARES, C.H.L., MATIAS, W.G. & LOPES, E.B. (2000). **Avaliação da toxicidade aguda de efluentes de uma indústria têxtil utilizando Daphnia magna, Poecilia reticulata e Vibrio fischeri como bioindicadores**. In: Espíndola, E.L.G.; Paschoal, C.M.R.B.; Rocha, O.; Bohrer, M.B.C.; Oliveira-Neto, A.L. (Ed.) **Ecotoxicologia – Perspectivas para o século XXI**. São Carlos: Ed. Rima, p.365-375.
- BARCELLOS, P.P. (1986). Impactos Ambientais da Indústria do Petróleo – da Produção ao Consumo Final. **Dissertação de Mestrado**. Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-

- Graduação e Pesquisa de Engenharia, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, Brasil.
- BARDGETT, R.D.; SPEIR, T.W.; ROSS, D.J.; YEATES, G.W. & KETTLES, H.A. (1994). Impact of pasture contamination by Cooper, chromium and arsenic timber preservative on soil microbial properties and nematodes. **Biology and Fertility of Soils**. 18: 71-79.
- BELZ, R.G.; CEDERGREEN, N. & SORENSEN, H. (2008). Hormesis in mixtures – Can it be predicted? **Science of the Total Environment**. 404: 77-87.
- BERTOLETTI, E. (1990). Toxicidade e concentração de agentes tóxicos em efluentes industriais na grande São Paulo. **Ciência e Cultura**. 42: 271-277.
- BOEKELHEIDE, K. (2007). Mixed messages. **Toxicological Sciences**. 99: 1-2.
- BOUDOU, A. & RIBEYRE, F. (1989). **Fundamental concepts in aquatic ecotoxicology**. In: A. Boudou & F. Ribeyre (eds). **Aquatic ecotoxicology. - Fundamental concepts and methodologies**. p.35-75.
- BOULTON, S.J.; GARTNER, A.; REBOUL, J.; VAGLIO, P.; DYSON, N.; HILL, D.E. & VIDAL, M. (2002). Combined functional genomic maps of the *C. elegans* DNA damage response. **Science**. 295(5552): 127-131.
- BOYD W.A. & WILLIAMS P.L. (2003). Availability of metals to the nematode *Caenorhabditis elegans*: toxicity based on total concentrations in soil and extracted fractions. **Environmental Toxicology and Chemistry**. 22: 1100-1106.
- BOYD, W.A.; ANDERSON, G.L.; DUSENBERY, D.B. & WILLIAMS, P.L. (2000). Computer tracking method for assessing behavioral changes in the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Environmental Toxicology and Risk Assessment**. 9: 225-238.
- BRENTANO, D. M.; LOBO, E. A. (2004). Avaliação ecotoxicológica do processo produtivo de um curtume, utilizando *Daphnia magna* Straus como organismo teste. **Revista Brasileira de Toxicologia**: 17(2): 13-18.
- BRUSCA, R.C. & BRUSCA, G.J. (2007). **Invertebrados**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 968p.
- BUIKEMA, A.L. & VOSHELL, J.R. (1993). **Toxicity studies using freshwater benthic macroinvertebrates**. In: Rosenberg, D.M. & Resh, V.H. **Freshwater biomonitoring and benthic macroinvertebrates**. New York: Chapman and Hall. 488p.
- BUIKEMA JR, A.L.; LEE, D.R. & CAIRNS JR., J. A. (1976). Screening bioassay using *Daphnia pulex* for refinery wastes discharged into freshwater. **Journal of Testing and Evaluation**, 4: 119-125.

- BURTON JR., G.A.; GREENBERG, M.S.; ROWLAND, C.D.; IRVINE, C.A.; LAVOIE, D.R.; BROOKER, J.A.; MOORE, L.; RAYMER, D.F.N. & MCWILLIAM, R.A. (2005). *In situ* exposures using caged organisms: a multi-compartment approach to detect aquatic toxicity and bioaccumulation. **Environmental Pollution**, 134: 133–144.
- CAIRNS, J.JR. & NIEDERLEHNER, B.R. (1995). **Ecological toxicity testing**. Boca Raton, USA: Lewis Publishers. 228p.
- CALABRESE, E.J. & BLAIN, R. (2005). The occurrence of hormetic dose responses in the toxicological literature, the hormesis database: an overview. **Toxicology and Applied Pharmacology** 202: 289-301.
- CALABRESE, E.J. (2009). Hormesis: A conversation with a critic. **Environmental Health Perspectives** 117(9): 1339-1343.
- CESAR, A.; MARÍN-GUIRAO, L.; VITA, R. & MARÍN, A. (2002). Sensibilidade de anfípodos y erizos del Mar Mediterráneo a substâncias tóxicas de referência. **Ciencias Marinas**. 28(4): 407-417.
- CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. (1990). **Procedimentos para utilização de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos**. São Paulo: CETESB. 17p.
- CHAPMAN, P.M.; BISHAY, F.; POWER, E.; HALL, K.; HARDING, L.; MCLEAY, D.; NASSICHUK, M. & KNAPP, W. (1990). Refinery effluent biomonitoring. **Proceedings of the 70<sup>th</sup> Annual Aquatic Toxicology Workshop**. Vancouver, Canadá. p.106-206.
- CHAPMAN, P.M.; POWER, E.A. & BURTON JR., G.A. (1992). **Integrated assessments in aquatic ecosystems**. In: Burton, G.A. **Sediment toxicity assessment**. Boca Raton, USA: Lewis Publishers.
- CHAPMAN, P.M.; PAINE, M.D.; MORAN, T. & KIERSTEAD, T. (1994). Refinery water (intake and effluent) quality: update 1970s with 1990s toxicity testing. **Environmental Toxicology and Chemistry**. 13: 897-909.
- CHAPMAN, P.M. (2002). Ecological risk assessment (ERA) and hormesis. **The Science of the Total Environment**. 288: 131-140.
- CHIOCHETTA, C.G. & CHIOCHETTA, M. (2006). Aplicação do Teste de Assimilação e Dissimilação (A-D) para observação de efeitos tóxicos em águas superficiais. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology** 1(2): 97-101.
- COLLARES, S. (2004). Avaliação do uso de recursos hídricos em refinarias de petróleo: um estudo de caso na Petrobras. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal

- Fluminense. Niterói, RJ, Brasil. 150p.
- CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente. (2005). Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Ministério do Meio Ambiente. 23p.
- CONSEMA/RS – Conselho Estadual do Meio Ambiente. (2006). Resolução nº 129, de 24 de novembro de 2006. Secretaria do Meio Ambiente. 8p.
- COONEY, J.D. (1995) **Sediment Tests**. In: Rand, G.M. **Fundamentals of aquatic toxicology. Effects, environmental fate and risk assessment**. Washington, USA: Taylor & Francis.
- DAJOZ, R. (1979). **A poluição II. O panorama das poluições**. In: **Enciclopédia de Ecologia**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, p.159-251.
- DAJOZ, R. (2005). **Princípios de Ecologia**. 7 ed. Porto Alegre: Artmed. 520p.
- DALLA COLLETTA, V. (2008). Avaliação ecotoxicológica da eficiência da detoxificação do efluente tratado pela estação de tratamento de esgotos da Universidade de Santa Cruz do Sul, RS, Brasil. **Dissertação de Mestrado**. UNISC, Santa Cruz do Sul, RS, Brasil. 100p.
- DAMATO, M. & SOBRINHO, P.A. (1996). Determinação da toxicidade crônica em efluentes finais de refinaria de petróleo para *Ceriodaphnia dubia*. In: Congresso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. **Anais**. pp. 1-7. Cidade do México.
- DAMATO, M.; ALEM SOBRINHO, P. & MORITA, D.M. (1997). Determinação da toxicidade aguda de efluentes de refinaria de petróleo em diversas etapas de tratamento para *Daphnia similis*. In: 19º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. **Anais**. pp. 199-212. Foz do Iguaçu.
- DAMATO, M.; ALEM SOBRINHO, P. & MORITA, D.M. (1998). Estudo da influência do nível de tratamento de efluentes de refinaria de petróleo na remoção de hidrocarbonetos aromáticos polinucleares e na toxicidade aguda para *Daphnia similis*. In: XXVI Congresso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. **Anais**. Lima.
- DIN 38 412-L 8. (1991). Determination of the inhibitory effect of water constituents on bacteria (*Pseudomonas cell* multiplication inhibition test).
- DIN 38 412-L 34 .(1991). Determination of the inhibitory effect of waste water on the light emission of *Photobacterium phosphoreum* (luminescent bacteria waste water test).
- DONKIN, S.G. & DUSENBERY, D.B. (1993). A soil toxicity test using the nematode *Caenorhabditis elegans* and an effective method of recovery. **Archives of**

- Environmental Contamination and Toxicology** 25: 145-151.
- DORRIS, T.C.; BURKS, S.L.; CURD, M.R.; WALLER, G.R. & BROEMELING, L.D. (1972). **Identification of toxic components in oil refinery effluents and determination of their effects upon the aquatic biota**. Stillwater: National Technical Information Service PB 213. 50p.
- DORRIS, T.C.; BURKS, S.L. & WALLER, G.R. (1974). **Effects of residuals toxicins in oil refinery effluents on aquatic organisms**. Stillwater: U.S. Department of the Interior. 79p.
- EPA – United States Environmental Protection Agency. (2002a). **Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms**. 5.ed. Washington, DC. EPA-821-R-02-012. 266p.
- EPA – United States Environmental Protection Agency. (2002b). **Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms**. 4.ed. Washington, DC. EPA-821-R-02-013. 335p.
- FERNICOLA, A. G. G.; BOHRER-MOREL, M. B. C. & BAINY, A. C. D. (2003). **Ecotoxicologia**. p. 221-243. In: Azevedo, F. A.; Chasin, A. A. M. **As Bases Toxicológicas da Ecotoxicologia**. São Carlos: RiMa, 2003. São Paulo: Intertox, 340p.
- FOMIN, A.; OEHLMANN, J. & MARKERT, B. (2003). **Praktikum zur Ökotoxikologie – Grundlagen und Anwendungen biologischer Testverfahren**. Ecomed: Landsberg, Alemanha. 239p.
- FONSECA, A.L. (1991). **A biologia das espécies *Daphnia laevis*, *Ceriodaphnia silvestrii* (Crustácea, Cladocera) e *Poecilia reticulata* (Pisces, Poecillidae) e o comportamento destes em testes de toxicidade aquática com efluentes industriais**. Dissertação de Mestrado em Hidráulica e Saneamento. Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo. 210p.
- FONTANELLA, A.C. (2007). Adaptação do Teste A-D para sua aplicação em águas e sedimentos com alta poluição orgânica. **Dissertação de mestrado**. Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS, Brasil. 154p.
- FREEMAN M.N.; PEREDNEY, C.L. & WILLIAMS, P.L. (2000). A soil bioassay using the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Environmental Toxicology and Risk Assessment** 9: 305-318.
- GARTNER, A.; MACQUEEN, A.J. & VILLENEUVE, A.M. (2004). Methods for analyzing checkpoint responses in *Caenorhabditis elegans*. **Methods in Molecular Biology**:

- Checkpoint Controls and Cancer. 280(2): 257-274.
- GEORGETTI, M.S.; ROCHA, O. & SALVADOR, N.N.B. (2008). Impactos tóxicos causados pelo lançamento de efluentes químicos em corpos d'água. In: III Workshop de Ecotoxicologia. **Anais**. Rio Claro.
- GERHARDT, A.; SCHMIDT, S.; & HÖSS, S. (2002). Measurement of movement patterns of *Caenorhabditis elegans* (Nematoda) with the Multispecies Freshwater Biomonitor (MFB) – a potential new method to study a behavioral toxicity parameter of nematodes in sediments. **Environmental Pollution** 120: 513-516.
- GUIMARÃES, G.L.; FOLONI, L.L.; PITELI, R. & MARTINS, A.T. (2003). Metodologia para avaliação de impacto ambiental de macrófitas em mesocosmos. **Planta Daninha**. 21: 27-42.
- GUNKEL, G. (1994). **Bioindikation in aquatischen Ökosystemen**. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag Jena. 540p.
- GURGEL, A.M.; MEDEIROS, A.C.L.V.; ALVES, P.C.; SILVA, J.M.; GURGEL, I.G.D. & AUGUSTO, L.G.S. (2009). *Framework* dos cenários de risco no contexto da implantação de uma refinaria de petróleo em Pernambuco. **Ciência e Saúde Coletiva**. 14(6): 2027-2038.
- HACON, S.S. (2003). Avaliação e gestão do risco ecotoxicológico à saúde humana. In: Azevedo, F.A. & Chasin, A.A.M. **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. São Carlos: RiMa. 340p.
- HAMILTON, M. A.; RUSSO, R. C. & THURSTON, R. V. (1979). Trimmed Spearman-Kärber method for calculation of EC50 and LC values in bioassays. **Burlington Research**. 7(11): 114-119.
- HARTMANN, C.C. (2004). Avaliação de um efluente industrial através de ensaios ecotoxicológicos e análises físicas e químicas. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 85p.
- HENRY, T.B.; KWON, J.W.; ARMBRUST, K.L. & BLACK, M.C. (2004). Acute and chronic toxicity of five selective serotonin reuptake inhibitors in *Ceriodaphnia dubia*. **Environmental Toxicology and Chemistry**. 23(9): 2229-2233.
- HOSHINA, M.M. & MARIN-MORALES, M.A. (2010). Evaluation of the genotoxicity of petroleum refinery effluents using the comet assay in *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia). **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology** 5(1): 75-79.
- HÖSS S.; HAITZER, M.; TRAUNSPURGER, W.; GRATZER, H.; AHLF, W. & STEINBERG, C. (1997). Influence of particle size distribution and content of organic



- matter on the toxicity of copper in sediment bioassays using *Caenorhabditis elegans* (Nematoda). **Water, Air & Soil Pollution** 99: 689-695
- HÖSS, S.; AHLF, W.; FAHNENSTICH, C.; GILBERG, D.; HOLLERT, H.; MELBYE, K.; MELLER, M.; HAMMERS-WIRTZ, M.; HEININGER, P.; NEUMANN-HENSEL, H.; OTTERMANN, R.; RATTE, H.T.; SEILER, T.B.; SPIRA, D. & FEILER, U. (2010). Variability of sediment-contact tests in freshwater sediments with low-level anthropogenic contamination – Determination of toxicity thresholds. **Environmental Pollution**. 158: 2999-3010.
- ISO/DIS 10872. (2009). Water quality – Determination of the toxic effect of sediment and soil samples on growth, fertility and reproduction of *Caenorhabditis elegans* (Nematoda).
- KNIE, J. L. W. & LOPES, E. W. B. (2004). **Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações**. Florianópolis: FATMA/GTZ, 2004. 289p.
- KREBS, F. (1985). Ökotoxikologische Bewertung von Abwässern und Umweltchemikalien, Forschungsbericht, Forschungsvorhaben 102 05 115, Umweltforschungsplandes Bundesministeriums des Innern. Koblen: Bundesanstalt für Gewässerkunde. 135p.
- KREBS, F. (2005). **The PT-method as a Hazard Assessment Scheme for Sediments and Dredged Material**. In: Blaise, C. & Féraud, J.F. **Small-scale freshwater toxicity test methods**. Berlin: Springer-Verlag. pp. 1-24.
- KURZ, C.L. & EW BANK, J. (2000). *Caenorhabditis elegans* for the study of host-pathogen interactions. **Trends in Microbiology**, 8(3): 142-144.
- LAITANO, K.S. & MATIAS, W.G. (2006). Testes de toxicidade com *Daphnia magna*: uma ferramenta para avaliação de um reator experimental UASB. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**. 1(1): 43-47.
- MACQUEEN, A.J. & VILLENEUVE, A.M. (2001). Nuclear reorganization and homologous chromosome pairing during meiotic prophase require *C. elegans* chk-2. **Genes & Development** 15: 1674-1687
- MAGALHÃES, D.P. & FERRÃO-FILHO, A.S. (2008). A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis** 12(3): 355-381.
- MARIANO, J.B. (2001). Impactos ambientais do refino de petróleo. **Dissertação de Mestrado**. Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, Brasil. 279p.
- MARSCHNER, A. (1999). **Biologische Bodensanierung und ihre Erfolgskontrolledurchsch**

- Biomonitoring.** In: Oehlmann, J. & Markert, B. (Ed.) **Ökotoxikologie. Ökosystemare Ansätze und Methoden.** Landsberg: Ecomed.
- MATTEWS, J.E. (1976). **Acute toxic effects of petroleum refinery wastewaters on readear sunfish.** Ada USEPA (PB262 913). 54p.
- MAZON, A.F.; PINHEIRO, G.H.D. & FERNANDES, M.N. (2000). **Contaminação dos ecossistemas aquáticos pelo cobre e risco potencial à biodiversidade: estudo da toxicidade do cobre em curimatá, *Prochilodus scrofa* (Teleostei, Prochilodontidae).** In: Espíndola, E.L.G.; Paschoal, C.M.R.B.; Rocha, O.; Bohrer, M.B.C.; Oliveira-Neto, A.L. (Ed.) **Ecotoxicologia – Perspectivas para o século XXI.** São Carlos: Ed. Rima, p. 327-339.
- MENDONÇA, L.C. (2002). Microbiologia e cinética de sistema de lodos ativados como pós-tratamento de efluente de reator anaeróbio de leito expandido. **Tese de Doutorado.** Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos, Brasil. 219p.
- MIGUEL, A.R.; BEVILACQUA, N.; GUERRA, P.A.D.V. & BAPTISTELLI, S.C. (2004). **Tratamento de águas residuárias domésticas.** In: Romero, M.A.; Philippi Jr., A. & Bruna, G.C. **Panorama ambiental da metrópole de São Paulo.** São Paulo: Signus. p. 77-103.
- NEMEROW, N. L. (1995). **Zero Pollution for Industry.** 1 ed. New York: John Wiley & Sons, 1995.
- NEWMAN, M.C. & UNGER, M.A. (2003). **Fundamentals of Ecotoxicology.** 2 ed. Boca Raton, USA: Lewis Publishers.
- OLIVEIRA-FILHO, E.C.; DA-MATTA, A.C.; CABRAL, L.L.; VEIGA, L.F. & PAUMGARTTEN, F.J.R. (2008). Comparison between four and seven-day *Ceriodaphnia dubia* survival and reproduction test protocols using oil refinery effluent samples. **Brazilian Archives of Biology and Technology** 51(1): 137-142.
- PANDARD, P., DEVILLERS, J., CHARISSOU, A.M.; POULSEN, V.; JOURDAIN, M.J.; FÉRARD, J.F.; GRAND, C. & BISPO, A. (2006). Selecting a battery of bioassays for ecotoxicological characterization of wastes. **Science of the Total Environment:** 363: 114-125.
- PAULUS, M. (1998). Bewertungsgrundlagen für das Rückstandsorientierte biomonitoring in der Bundesrepublik Deutschland. **Tese de Livre Docência.** Universität der Saarlandes. Saarbrücken, Alemanha. 346p.
- PLAA, G.L. (1982). Present status: toxic substances in the environment. **Canadian Journal**

- of **Physiology and Pharmacology**. 60: 1010-1016.
- PUSCEDDU, F.H. (2009). Avaliação ecotoxicológica do fármaco Triclosan para invertebrados de água doce com ênfase em ensaios com sedimento marcado (“spiked sediment”). **Dissertação de Mestrado**. Universidade de São Paulo. São Paulo, Brasil. 116p.
- RAMADE, F. (1977). **Ècotoxicologie**. Paris, France: Masson. 205p.
- RAND, G. M. & PETROCELLI, S. R. (1985). **Fundamentals of Aquatic Toxicology: Methods and Applications**. New York: Hemisphere Publishing Corporation.
- RAND, G.M., WELLS, P.G. & MACCARTY, L.S. (1995). **Introduction to Aquatic Toxicology**. In: RAND, G.M. **Fundamentals of aquatic toxicology. Effects, environment al fate and risk assessment**. Washington, USA: Taylor & Francis.
- RECCE, C.H. (1983). Isolation and chemical characterization of petroleum refinery wastewater fractions acutely lethal to *Daphnia magna*. **Tese de Doutorado**. Oklahoma State University, Oklahoma, USA. 86p.
- RINALDO, C.; BAZZICALUPO, P.; EDERLE, S.; HILLIARD, M. & LA VOLPE, A. (2002). Roles for *Caenorhabditis elegans* rad-51 in meiosis and in resistance to ionizing radiation during development. **Genetics**. 160: 471-479.
- RUBINGER, C.F. (2009). Seleção de métodos biológicos para a avaliação toxicológica de efluentes industriais. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, Brasil. 71p.
- RUPPERT, E. E. & BARNES, R. D. (1996). **Zoologia dos Invertebrados**. 6 ed. São Paulo: Roca. 1029p.
- SHERRY, J.B.; SCOTT, B.F.; NAGY, E. & DUTKA, B.J. (1994). Investigation of sublethal effects of some petroleum refinery effluents. **Journal of Aquatic Ecosystem Health**. 3: 129-137
- SOCHOVÁ, I.; HOFMAN, J & HOLOUBEK, I. (2006). Using nematodes in soil ecotoxicology. **Environmental International**. 32: 374-383.
- STUBBLEFIELD, W.A. & MAKI, W. (1982). **Environmental safety assessment of oil refinery effluents**. In: Bergman, H.L.; Kimerle, R.A. & Maki, A.W. (Ed.). **Environmental hazard assessment of effluents**. New York, USA: Pergamon Press. p. 282-296.
- TAMBELLINI, A.T. & CÂMARA, V.M. (1998). A temática saúde e ambiente no processo de desenvolvimento do campo da saúde coletiva: aspectos históricos, conceituais e metodológicos. **Ciência e Saúde Coletiva**. 3(2): 47-59.

- TAN, M.W, RAHME, L.G., STERNBERG, J.A., TOMPKINS, R.G. & AUSUBEL, F.M. (1999). *Pseudomonas aeruginosa* killing of *Caenorhabditis elegans* used to identify *P. aeruginosa* virulence factor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 96: 2408-2413.
- TAVARES, T.M. & CARVALHO, F.M. (1992). Avaliação de exposição de populações humanas a metais pesados no ambiente: exemplos do recôncavo baiano. **Química Nova**. 15(2): 147-154.
- THIBAUT, G.T. & TRACY, K. (1978). Controlling and monitoring activated-sludge units. **Chemical Engineering Journal**, 85: 155-160
- TORRES, A.P.R.; SANTIAGO, V.M.J. & BORGES, C.P. (2008). Performance evaluation of submerged membrane bioreactor pilot units for refinery wastewater treatment. **Environmental Progress**. 27(2): 189-194.
- TRAUNSPURGER, W.; HAITZER, M.; HÖSS, S.; BEIER, S.; AHLF, W. & STEINBERG, C. (1997). Ecotoxicological assessment of aquatic sediments with *Caenorhabditis elegans* (Nematoda) – A method for testing liquid medium and whole-sediment samples. **Environmental Toxicology and Chemistry**. 16(2): 245-250.
- TRUHAUT, R. (1977). Ecotoxicology: objectives, principles and perspectives. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 1: 151-173.
- TSUKAMOTO, T.K., KILLION, H.A. & MILLER, G.C. (2004). Column experiments for microbiological treatment of acid mine drainage: low-temperature, low-pH and matrix investigations. **Water Research**. 38: 1405-1418.
- USEPA – United States Environmental Protection Agency. (1989). **Toxicology Handbook**. Government Institutes, Inc.
- VAN STRAALLEN, N.M. (2003). Ecotoxicology becomes stress ecology. **Environmental Science and Technology**. 37(17): 324-330.
- WOOD, W.B. (1988). **The nematode *Caenorhabditis elegans***. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

## **ANEXOS**

**Anexo 1.** Relatório de determinação de metais pesados da água de cultivo de *Daphnia magna*, proveniente da Represa do Samuara, Caxias do Sul, RS.



## Relatório de Ensaio

CEAN – FG 201 rev 01  
Central Analítica

### SOLICITAÇÃO DE SERVIÇO INTERNA – Nº 230294

Cliente: Projeto Lodos Ativados - Petrobrás

Endereço: Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130 – Bairro: Petrópolis

Cidade: Caxias do Sul

CEP: 95070-560

Natureza do Trabalho:

**DETERMINAÇÃO DE METAIS**

Data:  
20/02/2009

Fl.: 01/01

#### DADOS DA AMOSTRA

Identificação do cliente: água de represa (Samuara)

Data da coleta: 03/02/2009

Horário da coleta: 15h

Data do recebimento: 03/02/2009

Horário do recebimento: 16h

Responsável pela coleta e preservação da amostra: O cliente

Período de Análise: 05/02/2009 à 13/02/2009

Data da revisão: 20/02/2009

#### ENSAIOS REALIZADOS

Parâmetros	Resultados	Limite de detecção	Incerteza	Metodologia Utilizada
Alumínio total** (mg/L)	0,047	0,007	-	SM * - Método 3030 E e 3120 B
Cádmio total (mg/L)	< 0,03	0,03	-	SM * - Método 3111 B
Chumbo total (mg/L)	< 0,05	0,05	-	SM * - Método 3111 B
Cobre total (mg/L)	< 0,01	0,01	-	SM * - Método 3111 B
Cromo total (mg/L)	< 0,04	0,04		SM * - Método 3111 B
Ferro total (mg/L)	0,43	0,04		SM * - Método 3111 B
Manganês total (mg/L)	0,05	0,01		SM * - Método 3111 B
Níquel total (mg/L)	< 0,05	0,05		SM * - Método 3111 B
Mercúrio** (mg/L)	Não detectado	0,0002		SM * - Método 3112 B
Zinco total (mg/L)	0,02	0,01		SM * - Método 3111 B

OBS.: Os parâmetros analisados foram unicamente os solicitados pelo cliente.

NOTA:

(\*) SM: Standard Methods for Examination of Water and Wastewater, 21th edition: 2005.

(\*\*) Análise realizada pelo laboratório ALAC.

As condições ambientais nas salas, onde são executados os ensaios, são mantidas na temperatura de 20±5°C e umidade 60±15%.

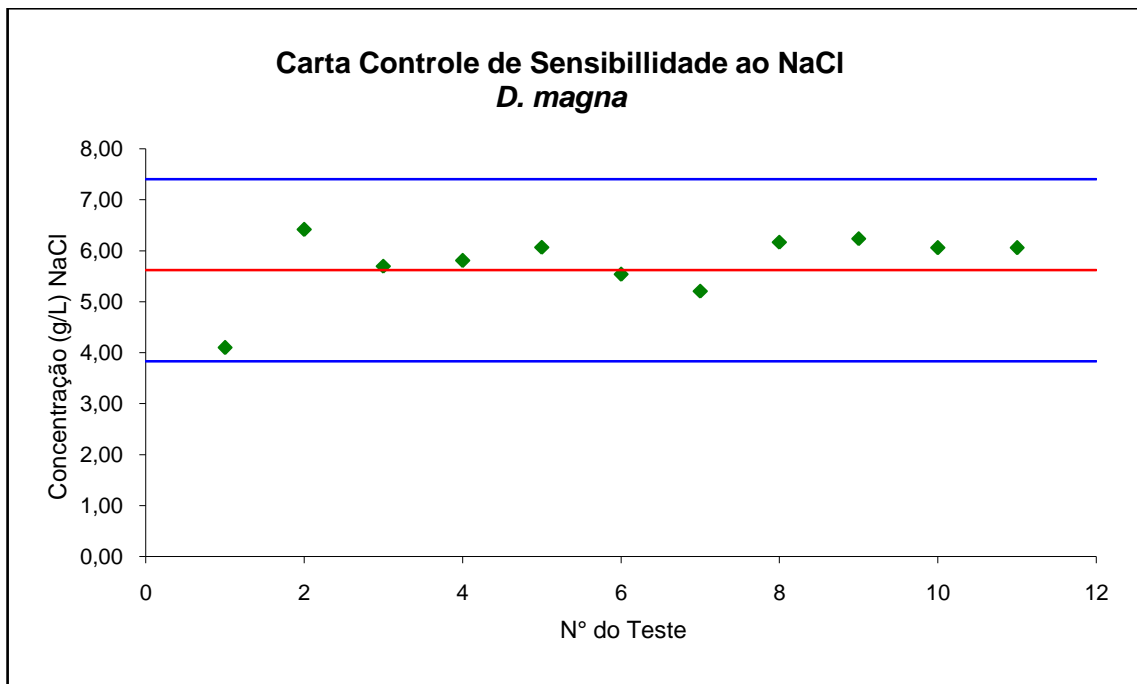
  
Anna Celia Silva Arruda  
Responsável Técnico Titular  
CRQ 05200263

A CEAN-UCS está cadastrada junto à FEPAM como Laboratório de Análises Ambientais sob Nº 23/2007 – DL válido até 10/07/2009.

NOTA: Os resultados contidos neste Relatório de Ensaio têm significação restrita e se aplicam tão somente às amostras coletadas na data especificada no presente documento.

Não é permitida a reprodução parcial deste Relatório de Ensaio.

**Anexo 2.** Carta controle de sensibilidade ao NaCl de *Daphnia magna*.



**Anexo 3.** Carta controle de sensibilidade ao NaCl de *Ceriodaphnia dubia*.

