

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
AMBIENTAL**

Letícia Flohr

**APLICAÇÃO E VALIDAÇÃO DO MODELO WT_{tox} PARA
AVALIAR RISCO AMBIENTAL TOXICOLÓGICO DE
MISTURAS COMPLEXAS: ESTUDO DE CASO EM AMOSTRAS
DE RESÍDUOS INDUSTRIAIS.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para obtenção do título de Doutor em Engenharia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. William Gerson Matias

Florianópolis (SC)

2011

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

F629a Flohr, Leticia

Aplicação e validação do modelo WTox para avaliar risco ambiental toxicológico de misturas complexas [tese] : estudo de caso em amostras de resíduos industriais / Leticia Flohr ; orientador, William Gerson Matias. - Florianópolis, SC, 2011. 1 v.: il., grafs., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental.

Inclui referências

1. Engenharia ambiental. 2. Resíduos industriais - Aspectos ambientais. 3. Daphnia. 4. *Vibrio fischeri*. 5. Tilápia (Peixe). 6. Toxicidade - Testes. I. Matias, William Gerson. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental. III. Título.

CDU 628.4



TERMO DE APROVAÇÃO

"Aplicação e Validação do Modelo WTox para Avaliar Risco Ambiental Toxicológico de Misturas Complexas"

Leticia Flohr

A Tese foi julgada e aprovada pela banca examinadora no Programa de Pós Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de

DOUTORA EM ENGENHARIA AMBIENTAL

Aprovado por:

Prof. Armando Borges de Castilhos Júnior, Dr.

Prof. Flávio Rubens Lapólli, Dr.

Prof.ª Célia Regina Monte Barardi, Dr.ª

Prof. Fábio Kummrow, Dr.

Prof. Moacir Aloísio Torres, Dr.

Prof. Sérgio Túlio Alves Cassini, Dr.

Prof. William Gerson Matias, Dr.
(Orientador)

Prof. Flávio Rubens Lapólli
(Coordenador PPGEA)

FLORIANÓPOLIS, SC – BRASIL
OUTUBRO/2011.

Dedico este trabalho aos meus pais, Dagmar e Ivo, e à minha irmã Roberta, pelo exemplo de força e união, e por estarem ao meu lado, me incentivando em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor Dr. William Gerson Matias, pela oportunidade de aprender, pela dedicação e pela confiança depositadas em mim durante todos estes anos de trabalho.

À Professora Dra. Cátia Regina Silva de Carvalho Pinto, por sua contribuição e conhecimentos repassados em muitas etapas deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental – PPGEA, pela oportunidade e serviços prestados.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior – CAPES, pela bolsa de doutorado.

À equipe do Laboratório de Toxicologia Ambiental – LABTOX, pela convivência e experiências compartilhadas, especialmente às colegas Cristiane, Cristina, Grazieli e Sílvia por suas valiosas contribuições e auxílio na execução dos ensaios de toxicidade.

Aos membros do Laboratório Integrado do Meio Ambiente – LIMA, pelo apoio na execução da parte experimental do trabalho.

À Momento Engenharia Ambiental Ltda, em especial à Engenheira Ane-Mery Pisetta e à equipe do Aterro Industrial e Sanitário de Blumenau, por disponibilizar as amostras de resíduos.

À Piscicultura Panamá Ltda, por ceder os peixes para esta pesquisa.

À Izabela, Marcos e Umberto, e aos meus filhotes Viola, Uli, Pik-pik e Speeda, por serem minha segunda família, e pelo carinho, incentivo e amizade.

"A máquina não isola o homem dos grandes problemas da natureza, mas insere-o mais profundamente neles."

(Antoine de Saint-Exupéry, 1939)

RESUMO

A contaminação do ecossistema aquático acontece de diversas maneiras, por exemplo, o corpo d'água pode ser atingido por esgotos domésticos, efluentes industriais, arraste de agrotóxicos e fertilizantes, e lixiviação de resíduos perigosos. Os modelos matemáticos são importantes ferramentas de gestão ambiental e gerenciamento de riscos. Modelos sobre a previsão da toxicidade de componentes químicos já estão bastante desenvolvidos, e são comumente utilizados quando um acidente ambiental já aconteceu, ou então para estimar riscos em locais previamente determinados. Mas previsões sobre a toxicidade de misturas químicas ainda devem ser aprimoradas, devido à complexidade dos efeitos que podem causar aos seres vivos. A dificuldade de se estimar a toxicidade com base nos resultados de análises físico-químicas é um fato esperado, pois desde que a toxicidade é um fenômeno biológico, a utilização de testes baseados em respostas biológicas parece ser mais apropriada. Assim, neste trabalho avaliou-se o risco ambiental, abordando a necessidade do estudo da relação entre o organismo e os xenobióticos. Para isto, foram aplicados seis tipos de testes toxicológicos através do Modelo WTox (software). Utilizando esta metodologia foi possível realizar uma avaliação e obter a classificação do risco de substâncias ou compostos potencialmente tóxicos. Ensaio de toxicidade aguda foram realizados com os organismos *Daphnia magna* e *Vibrio fischeri*. Ensaio de toxicidade crônica foram realizados com o organismo *Daphnia magna*. Os testes de citotoxicidade e genotoxicidade foram realizados com o organismo *Oreochromis niloticus* (lipoperoxidação, frequência de micronúcleos e metilação do DNA). Um estudo de caso foi realizado com resíduos sólidos provenientes da indústria têxtil, metal-mecânica e de papel e celulose. Os resultados obtidos com a avaliação dos parâmetros toxicológicos demonstraram que diversos resíduos industriais induziram mortalidade, efeitos na reprodução, aumentos na taxa de lipoperoxidação, mutações e alterações na metilação do DNA dos organismos testados. Estes resultados, analisados em conjunto através do Modelo WTox, e validados através da comparação com outros modelos de avaliação de risco ambiental, permitiram a classificação de risco ambiental toxicológico dos resíduos industriais. A avaliação demonstrou que as amostras analisadas podem ser classificadas como de risco ambiental toxicológico significativo ou crítico.

Palavras-chave: risco ambiental, ensaios toxicológicos, resíduos sólidos industriais, *Daphnia magna*, *Vibrio fischeri*, *Oreochromis niloticus*.

ABSTRACT

The contamination of the aquatic ecosystem can happen in many ways, for example, ponds or rivers can be contaminated by domestic sewage, industrial effluents, drag of pesticides and fertilizers, and leaching of hazardous waste. Mathematical models are important tools for environmental management. Models about prediction of toxicity of chemical components are already well developed, and are commonly used when an environmental accident has happened, or to estimate risks at sites previously determined. Predictions about the toxicity of chemical mixtures must be enhanced due to the complexity of effects that can be caused to the living species. The difficulty to estimate the toxicity based only in physical-chemical parameters is an expected fact, because since the toxicity is a biological phenomenon, it seems more suitable to use tests based on biological responses. In this work, the environmental risk was accessed addressing the need to study the relationship between the organism and xenobiotics. Therefore, six toxicological endpoints were applied through the WTox Model (software). Using this methodology it was possible to make an evaluation and to obtain the risk classification of potentially toxic substances. Acute toxicity tests were performed with the organisms *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri*. Chronic toxicity tests were performed with the organism *Daphnia magna*. Citotoxicity and genotoxicity tests were performed with the organism *Oreochromis niloticus* (lipid peroxidation, micronucleus frequency and DNA methylation). A case study was conducted with solid wastes from textile, metal-mechanic and pulp and paper industries. The results obtained with the evaluation of toxicological parameters have shown that several industrial wastes induced mortality, reproductive effects, increases in the rate of lipid peroxidation, mutations and changes in DNA methylation of the organisms tested. These results, analyzed together through the WTox Model, and validated by comparison with other models of environmental risk assessment, allowed the classification of the environmental risk of industrial wastes. The evaluation showed that the toxicological environmental risk of the samples analyzed can be classified as significant or critical.

Keywords: environmental risk, toxicity tests, industrial solid waste, *Daphnia magna*, *Vibrio fischeri*, *Oreochromis niloticus*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Adaptação do Modelo Geral de Risco Ambiental.	39
Figura 2 – Matriz de riscos - correlação entre o parâmetro toxicológico (graus de toxicidade) com a gravidade induzida pelo xenobiótico.	46
Figura 3 – Aterro Industrial e Sanitário de Blumenau – SC.....	53
Figura 4 – Organismo-teste <i>Daphnia magna</i>	58
Figura 5 – Bactérias <i>Vibrio fischeri</i> emitindo luminescência	59
Figura 6 – a) Hemócitos normais e b) Hemócitos micronucleados.....	62
Figura 9 – Destruição da membrana celular sob o efeito de radicais livres oxigenados.....	64
Figura 10 – Química da lipoperoxidação de membranas celulares.....	65
Figura 11 – Reação de metilação do DNA catalisada pelas DNA-metiltransferases.	67
Figura 12 – Organismo-teste <i>Oreochromis niloticus</i>	68
Figura 13 – Fluxograma de Lixiviação de Resíduos, baseado no Anexo B da NBR 10005 (ABNT, 2004b).....	71
Figura 14 – Procedimento de preparação de amostras.....	72
Figura 15 – Esquema do teste de toxicidade aguda com <i>Daphnia magna</i>	75
Figura 16 – Esquema do teste de toxicidade crônica com <i>Daphnia magna</i>	76
Figura 17 – Microtox: equipamento (a), e esquema do termobloco (b).	78
Figura 18 – Esquema geral dos procedimentos para o teste de Metilação do DNA.	83
Figura 19 – Janela inicial do Software WTox.....	88
Figura 20 – Taxa da DNA-metilase ($m^5dC / (m^5dC + dC) * 100$), medida por HPLC, em amostras de eritrócitos de peixes <i>Oreochromis niloticus</i> expostos à fração solúvel de resíduos da indústria têxtil, ao controle positivo com dicromato de potássio (2,5 mg/L) e na ausência de contaminantes (controle negativo). Os valores representam a média entre cada réplica \pm desvio padrão (n=2). Nota: (*) $\alpha < 0,05$	110
Figura 21 – Taxa da DNA-metilase ($m^5dC / (m^5dC + dC) * 100$), medida por HPLC, em amostras de eritrócitos de peixes <i>Oreochromis niloticus</i> expostos à fração solúvel de resíduos da indústria metal-mecânica, ao controle positivo com dicromato de potássio (2,5 mg/L) e na ausência de contaminantes (controle negativo). Os valores representam a média entre cada réplica \pm desvio padrão (n=2). Nota: (*) $\alpha < 0,05$	111
Figura 22 – Taxa da DNA-metilase ($m^5dC / (m^5dC + dC) * 100$), medida por HPLC, em amostras de eritrócitos de peixes <i>Oreochromis niloticus</i> expostos à fração solúvel de resíduos da indústria de papel e celulose, ao controle positivo com dicromato de potássio (2,5 mg/L) e na ausência de contaminantes (controle negativo). Os valores representam a média entre cada réplica \pm desvio padrão (n=2). Nota: (*) $\alpha < 0,05$	112
Figura 31 – Fórmula do Índice PEEP (P).....	133

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Níveis dos possíveis resultados aplicados na matriz de risco.....	46
Quadro 2 – Intervalo das taxas dos parâmetros toxicológicos, conforme proposto por Matias (2002).....	47
Quadro 3 – Categorias de gravidade.....	48
Quadro 4 – Classificação de risco.....	49
Quadro 5 – Exemplo de utilização do cruzamento de informações.....	51
Quadro 6 – Série de diluições utilizadas nos testes agudos com <i>Vibrio fischeri</i>	79
Quadro 7 – Calibração do modelo WTox - Intervalo das taxas dos parâmetros toxicológicos.....	116
Quadro 8 – Avaliação de risco ambiental proposta por Tigini et al. (2011)....	122
Quadro 9 – Classificação de toxicidade de acordo com o Índice PEEP (P)....	129
Quadro 10 – Combinação de testes toxicológicos sugerido pelo método WTox.....	133
Quadro 11: Comparação entre informações incluídas em Modelos de Avaliação de Risco Ambiental.....	136

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características das amostras de resíduos industriais coletados no Aterro Industrial e Sanitário de Blumenau, conforme classificação da NBR 10004 (ABNT, 2004a).....	70
Tabela 2 – Concentrações de exposição à fração solúvel de resíduos industriais, adaptadas de acordo com respectiva referência bibliográfica.....	81
Tabela 3 – Resultados dos testes de sensibilidade com microcrustáceos <i>Daphnia magna</i> de diferentes lotes.....	90
Tabela 4 – Resultados dos testes de sensibilidade com bactérias <i>Vibrio fischeri</i> de diferentes lotes.....	91
Tabela 5 – Resultados dos testes de toxicidade aguda com <i>Daphnia magna</i> e <i>Vibrio Fischeri</i> para fração solúvel de resíduos das indústrias Têxtil, Metal-mecânica e de Papel e Celulose.....	92
Tabela 6 - Estudo da toxicidade crônica sobre a reprodução (número de organismos que reproduziram (n) e média ± desvio padrão) de <i>Daphnia magna</i> expostas à diversas concentrações (%) de frações solúveis de resíduos provenientes de quatro indústrias têxteis, codificadas como amostras TX1, TX2, TX3 e TX4, por um período de exposição de 21 dias.....	97
Tabela 7 - Estudo da toxicidade crônica sobre a reprodução (número de organismos que reproduziram (n) e média ± desvio padrão) de <i>Daphnia magna</i> expostas a diversas concentrações (%) de frações solúveis de resíduos provenientes de três indústrias metal-mecânicas, codificadas como amostras MM1, MM2 e MM3, por um período de exposição de 21 dias.....	99
Tabela 8 - Estudo da toxicidade crônica sobre a reprodução (número de organismos que reproduziram (n) e média ± desvio padrão) de <i>Daphnia magna</i> expostas à diversas concentrações (%) de frações solúveis de resíduos provenientes de três indústrias de papel e celulose, codificadas como amostras PP1, PP2 e PP3, por um período de exposição de 21 dias.....	101
Tabela 9 – Estudo da frequência de micronúcleos em eritrócitos de peixes <i>Oreochromis niloticus</i> expostos por 48 horas à diversas concentrações (%) de frações solúveis de resíduos provenientes das indústrias Têxtil, Metal-mecânica e de Papel e Celulose.....	104
Tabela 10 – Medida da taxa do MDA em peixes <i>Oreochromis niloticus</i> expostos por 48 horas à diversas concentrações (%) de frações solúveis de resíduos provenientes das indústrias Têxtil, Metal-mecânica e de	

Papel e Celulose. Os resultados são expressos em médias \pm desvio padrão em nMoles de MDA/mg de proteína.....	107
Tabela 11 – Análise de risco ambiental através do Modelo WTox, de acordo com os resultados observados na amostra TX1 (fração solúvel de resíduo da indústria têxtil).....	117
Tabela 12 – Análise de risco ambiental através do Modelo WTox, de acordo com os resultados observados na amostra TX2 (fração solúvel de resíduo da indústria têxtil).....	117
Tabela 13 – Análise de risco ambiental através do Modelo WTox, de acordo com os resultados observados na amostra TX3 (fração solúvel de resíduo da indústria têxtil).....	118
Tabela 14 – Análise de risco ambiental através do Modelo WTox, de acordo com os resultados observados na amostra TX4 (fração solúvel de resíduo da indústria têxtil).....	118
Tabela 15 – Análise de risco ambiental através do Modelo WTox, de acordo com os resultados observados na amostra MM1 (fração solúvel de resíduo da indústria metal-mecânica).....	119
Tabela 16 – Análise de risco ambiental através do Modelo WTox, de acordo com os resultados observados na amostra MM2 (fração solúvel de resíduo da indústria metal-mecânica).....	119
Tabela 17 – Análise de risco ambiental através do Modelo WTox, de acordo com os resultados observados na amostra MM3 (fração solúvel de resíduo da indústria metal-mecânica).....	119
Tabela 18 – Análise de risco ambiental através do Modelo WTox, de acordo com os resultados observados na amostra PP1 (fração solúvel de resíduo da indústria de papel e celulose).....	120
Tabela 19 – Análise de risco ambiental através do Modelo WTox, de acordo com os resultados observados na amostra PP2 (fração solúvel de resíduo da indústria de papel e celulose).....	120
Tabela 20 – Análise de risco ambiental através do Modelo WTox, de acordo com os resultados observados na amostra PP3 (fração solúvel de resíduo da indústria de papel e celulose).....	121
Tabela 21 – Combinação de testes para Avaliação de Risco Ambiental da amostra TX1 (fração solúvel de resíduo da indústria têxtil) através do Modelo WTox.....	123
Tabela 22 – Combinação de testes para Avaliação de Risco Ambiental da amostra TX2 (fração solúvel de resíduo da indústria têxtil) através do Modelo WTox.....	123
Tabela 23 – Combinação de testes para Avaliação de Risco Ambiental da amostra TX3 (fração solúvel de resíduo da indústria têxtil) através do Modelo WTox.....	123

Tabela 24 – Combinação de testes para Avaliação de Risco Ambiental da amostra TX4 (fração solúvel de resíduo da indústria têxtil) através do Modelo WTox.....	124
Tabela 25 – Combinação de testes para Avaliação de Risco Ambiental da amostra MM1 (fração solúvel de resíduo da indústria metal-mecânica) através do Modelo WTox.....	124
Tabela 26 – Combinação de testes para Avaliação de Risco Ambiental da amostra MM2 (fração solúvel de resíduo da indústria metal-mecânica) através do Modelo WTox.....	125
Tabela 27 – Combinação de testes para Avaliação de Risco Ambiental da amostra MM3 (fração solúvel de resíduo da indústria metal-mecânica) através do Modelo WTox.....	125
Tabela 28 – Combinação de testes para Avaliação de Risco Ambiental da amostra PP1 (fração solúvel de resíduo da indústria de papel e celulose) através do Modelo WTox.....	126
Tabela 29 – Combinação de testes para Avaliação de Risco Ambiental da amostra PP2 (fração solúvel de resíduo da indústria de papel e celulose) através do Modelo WTox.....	126
Tabela 30 – Combinação de testes para Avaliação de Risco Ambiental da amostra PP3 (fração solúvel de resíduo da indústria de papel e celulose) através do Modelo WTox.....	127
Tabela 31 – Classificação de perigo de resíduos da indústria metal-mecânica (amostras MM1, MM2 e MM3) de acordo com a metodologia proposta por Piva et al. (2011).....	131
Tabela 32 – Valores de PEEP (P) encontrados para amostras de fração solúvel dos resíduos da indústria de papel e celulose.....	134

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas.
AISB - Aterro Industrial e Sanitário de Blumenau.
CE₅₀ - Concentração da amostra que causa efeito agudo (imobilidade) a 50% dos organismos.
CENO - Concentração de efeito não observado.
CEO - Concentração de efeito observado.
CETESB - Companhia Estadual de Tecnologia Ambiental - São Paulo
CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente.
dC - Citosina.
DIN - *Deutsches Institut für Normung*.
DNA - Ácido desoxirribonucléico
FD - Fator de diluição.
HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*
ISO - *International Organization for Standardization*.
LABTOX - Laboratório de Toxicologia Ambiental.
MDA - Malondialdeído
m⁵dC - 5- metilcitosina.
NBR - Norma Brasileira.
OD - Oxigênio Dissolvido.
PEEP - *Potential Ecotoxic Effects Probe*.
pH - Potencial hidrogeniônico
PTFE - Politetrafluoretileno.
RNA - Ácido ribonucléico.
RNase - Ribonuclease.
SDS - Dodecilsulfato de sódio.
SOD - Superóxido dismutase.
TBA - Ácido 2-tiobarbitúrico.
U.S.EPA - *United State Environmental Protection Agency*.
UV- ultravioleta.
WTox - modelo de avaliação e classificação de risco toxicológico.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	29
1.1 HIPÓTESES DA PESQUISA	33
1.1.1 Primeira Hipótese	34
1.1.2 Segunda Hipótese	34
1.1.3 Terceira Hipótese.....	34
1.2 JUSTIFICATIVA.....	34
1.3 OBJETIVOS.....	35
1.3.1 Objetivo Geral	35
1.3.2 Objetivos Específicos	36
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	37
2.1 AVALIAÇÃO DE RISCO AMBIENTAL.....	37
2.2 MODELO WTox.....	44
2.2.1 Variáveis do Modelo WTox.....	44
2.2.2 Matriz de risco	45
2.2.3 Níveis de Toxicidade	46
2.2.4 Classificação do risco para cada parâmetro aplicado.....	48
2.2.5 Confirmação do risco pela avaliação cruzada entre os parâmetros.....	49
2.3 RESÍDUOS SÓLIDOS INDUSTRIAIS.....	51
2.3.1 Indústrias e Resíduos Industriais em Santa Catarina	52
2.3.2 Tratamento, Disposição Final e Gerenciamento de Resíduos Industriais	53
2.4 TOXICOLOGIA GLOBAL: TOXICIDADE AGUDA E CRÔNICA.....	54
2.4.1 Ensaios de Toxicidade Aguda.....	55
2.4.2 Ensaios de Toxicidade Crônica.....	56
2.4.3 Organismos utilizados em testes de toxicidade aguda e crônica: <i>Daphnia magna</i> e <i>Vibrio fischeri</i>	57
2.5 TOXICOLOGIA ESPECÍFICA: CITOTOXICIDADE, GENOTOXICIDADE E EPIGENÉTICA	59
2.5.1 Teste do Micronúcleo	61
2.5.2 Avaliação da lipoperoxidação pela dosagem do MDA.....	63
2.5.3 Avaliação da metilação biológica do DNA pela dosagem da m5dC	66

2.5.4 Organismo utilizado para testes de toxicologia específica: <i>Oreochromis niloticus</i>	68
3. MATERIAIS E MÉTODOS	69
3.1 RESÍDUOS INDUSTRIAIS - PROCEDIMENTOS.....	69
3.1.1 Amostragem	69
3.1.2 Obtenção da fração solúvel das amostras	71
3.1.3 Preservação da fração solúvel.....	73
3.2 ENSAIOS DE TOXICIDADE	73
3.2.1 Metodologia de cultivo de microcrustáceos <i>Daphnia magna</i>	73
3.2.2 Teste de toxicidade aguda com <i>Daphnia magna</i>	74
3.2.3 Teste de toxicidade crônica com <i>Daphnia magna</i>	75
3.2.4 Ensaio de toxicidade aguda com <i>Vibrio fischeri</i>	77
3.2.5 Aclimação de peixes <i>Oreochromis niloticus</i>	79
3.2.6 Exposição dos peixes às amostras da fração solúvel de resíduos industriais	80
3.2.7 Teste do micronúcleo.....	82
3.2.8 Metilação do DNA: extração e quantificação da 5- metilcitosina	82
3.2.9 Lipoperoxidação: Extração e Quantificação do MDA	85
3.2.10 Dosagem de proteínas.....	86
3.2.11 Análise estatística	86
3.3 MODELO WTox.....	87
3.3.1 Utilização dos dados toxicológicos no Modelo WTox.	87
3.3.2 Utilização do Software WTox	87
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	89
4.1 TESTES DE TOXICIDADE COM <i>Daphnia magna</i> e <i>Vibrio</i> <i>fischeri</i>	89
4.1.1 Sensibilidade do organismo-teste <i>Daphnia magna</i>	89
4.1.2 Sensibilidade do organismo-teste <i>Vibrio fischeri</i>	90
4.1.3 Ensaio de toxicidade aguda com <i>Daphnia magna</i> e <i>Vibrio</i> <i>fischeri</i>	91
4.1.4 Testes de toxicidade crônica com <i>Daphnia magna</i>	95
4.2 TESTES DE TOXICIDADE COM <i>Oreochromis niloticus</i>	102
4.2.1 Teste do micronúcleo.....	102
4.2.2 Avaliação da lipoperoxidação pela quantificação do MDA	106
4.2.3 Avaliação da metilação biológica do DNA pela quantificação da m5dC	109
4.3 MODELO WTox.....	114
4.3.1 Calibração do Modelo WTox	114

4.3.2 Validação do Modelo WT _{ox}	116
4.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	134
5. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES.....	139
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	141
7. APÊNDICES	163
A1. BASE DE DADOS PARA O MODELO WT _{ox}	163
A2. RESULTADOS - TESTES DE TOXICIDADE AGUDA.....	171
A3. TESTE DE TOXICIDADE AGUDA COM <i>Vibrio fischeri</i> – PROCEDIMENTOS UTILIZADOS	177
A4. RESULTADOS - TESTES DE TOXICIDADE CRÔNICA	179
A5. RESULTADOS - TESTE DE LIPOPEROXIDAÇÃO	187
A6. RESULTADOS - TESTE DE METILAÇÃO BIOLÓGICA DO DNA	191
A7. UTILIZAÇÃO DO SOFTWARE WT _{ox}	195
A8. RESULTADOS - AVALIAÇÃO DE RISCO RISCO AMBIENTAL DE RESÍDUOS INDUSTRIAIS ATRAVÉS DO ÍNDICE PEEP (P)	199
A9. ARTIGO 1	205
A10. ARTIGO 2	231

1. INTRODUÇÃO

A geração e a complexidade físico-química de resíduos e efluentes industriais vêm aumentando significativamente nos últimos anos. O avanço tecnológico aliado ao crescimento demográfico e a intensa atividade agrícola contribuem para a entrada de elementos químicos na água, no solo e no ar (Zagatto, 2006a).

Nos ecossistemas aquáticos a poluição ambiental acontece de diversas maneiras: o corpo d'água pode ser atingido por esgotos domésticos e efluentes industriais lançados sem tratamento adequado; pode ocorrer arraste de agrotóxicos e fertilizantes por escoamento superficial, e ainda, a lixiviação de resíduos perigosos que estão depositados no solo (Mozeto e Zagatto, 2006). Fericola et al., (2003) afirmam que os agentes químicos podem penetrar no ambiente de forma inesperada, por descuido ou acidente, ou de forma permitida ou controlada, visando algum efeito considerado positivo (econômico ou do ponto de vista da saúde pública). Uma vez que os seres humanos fazem parte do ecossistema, utilizando recursos naturais continuamente, sua saúde pode ser afetada indiretamente. Como exemplo, cita-se o consumo de peixe contaminado com pesticidas ou outros compostos solúveis (Galvão Filho e Newman, 2001). Pode também ocorrer uma intoxicação através do uso da água em situações como consumo, e em atividades recreativas ou industriais.

No Estado de Santa Catarina a economia industrial é caracterizada pela concentração em diversos pólos, sendo o têxtil, o metal-mecânico e o de papel e celulose setores importantes para o Estado (FIESC, 2010). A atividade industrial nestes setores gera resíduos sólidos e efluentes líquidos com potencial tóxico. Somando-se isto à falta de iniciativas quanto à proteção do meio ambiente, é cada vez maior o risco de problemas ambientais, principalmente em corpos d'água que recebem efluentes industriais não tratados ou lixiviados de resíduos industriais depositados de forma incorreta no solo. Efluentes líquidos e resíduos sólidos industriais são misturas complexas, compostas principalmente de elementos traços, dioxinas, furanos, fenóis, cloretos e cianetos (Ali e Srekrishnan, 2001; Sisinho, 2003).

No caso dos resíduos industriais, a geração, o transporte e o destino final devem ser constantemente monitorados, pois o risco de acidentes relacionados a estas etapas é elevado, e, além disto, como estes resíduos são compostos por misturas complexas, as interações destas substâncias e seus efeitos, tanto sobre o ambiente como sobre os seres vivos, em geral não são conhecidos. Portanto, a Toxicologia

Ambiental é a ciência mais indicada para avaliar os efeitos destes poluentes na saúde dos seres vivos e no meio ambiente. De acordo com Yu (2005), o estudo da toxicologia ambiental deriva do reconhecimento de que (a) a sobrevivência humana depende do bem-estar de outras espécies e da disponibilidade de ar, água e alimentos limpos; e (b) substâncias químicas antropogênicas, bem como produtos químicos naturais podem ter efeitos nocivos sobre os organismos vivos e processos ecológicos. Assim, a toxicologia ambiental estuda a forma como as substâncias tóxicas e sua interação com seres humanos, animais e plantas podem influenciar o bem-estar destes organismos.

De acordo com a Sociedade Americana de Química, existem aproximadamente 10 milhões de substâncias químicas mencionadas na literatura científica. Estima-se que 70 mil são de uso cotidiano, e que cerca de mil a duas mil novas substâncias são adicionadas a essa lista anualmente. Entretanto, apenas duas mil substâncias têm seus efeitos tóxicos conhecidos (Mozeto e Zagatto, 2006). Com o objetivo de detectar e quantificar substâncias potencialmente impactantes ao meio ambiente foram desenvolvidos vários métodos sofisticados de análises químicas. Tradicionalmente, havia uma tendência natural em supor que a toxicidade a organismos aquáticos poderia ser estimada por tais análises. Porém, segundo Knie e Lopes (2004), um laboratório bem equipado com aparelhos de medição modernos determina e quantifica, nas suas análises rotineiras, quando muito, 250 a 300 substâncias isoladas – diante de 30 a 100 mil substâncias (ou até mais) que ocorrem normalmente em rios medianamente a muito poluídos, ou em efluentes industriais. Além disso, mesmo que essas técnicas forneçam dados importantes sobre os poluentes ambientais, no ambiente aquático natural os organismos são expostos não somente a uma única substância tóxica, mas em geral, estas se constituem de misturas complexas (Rand, 1995).

A exposição às misturas pode resultar em interações toxicológicas, onde o contato com duas ou mais substâncias químicas resulta em uma resposta biológica quantitativamente ou qualitativamente diferente da que era esperada pela ação de cada uma das substâncias químicas separadas. A mistura de substâncias pode causar efeitos aditivos, sinérgicos, de potenciação ou antagônicos (Rand, 1995).

Diversos trabalhos mostram que os resultados sobre as estimativas de toxicidade através das análises químicas são insatisfatórios, e que não existem evidências de correlação entre toxicidade e análises físico-químicas de misturas complexas. A U.S.EPA (1986) não obteve valores significativos de correlação entre a

toxicidade dos efluentes de refinaria de petróleo com as variáveis ambientais. A CETESB (1987) verificou que a toxicidade de diversos efluentes industriais estudados não estava obrigatoriamente ligada ao nível de agentes tóxicos analisados. Flohr (2005, 2007) e Silva et al., (2011) analisaram lixiviados de resíduos industriais e concluíram que em vários deles a classificação conforme a Norma de Classificação de Resíduos NBR 10004 (ABNT, 2004a) não correspondia ao seu real potencial de toxicidade.

Silva et al. (2003), comentam que apesar do progresso no desenvolvimento de modelos preditivos sobre a toxicidade de componentes químicos, previsões sobre a toxicidade de misturas químicas devem ser realizadas, em parte devido à enorme complexidade dos efeitos que essas misturas podem causar em seres vivos. A genotoxicidade de misturas pode ser sinergicamente aumentada quando comparada com a genotoxicidade dos componentes da mistura testados individualmente, portanto existe uma necessidade de se avaliar os efeitos biológicos das misturas químicas.

Como os micropoluentes podem interagir sinergicamente ou antagonicamente, a combinação de efeitos destes micropoluentes não podem ser prognosticados por análises químicas, portanto, análises químicas não são suficientes para prever riscos ambientais e devem ser complementadas por estudos toxicológicos (Lambolez et al., 1994). A dificuldade de se estimar a toxicidade com base nos resultados de análises físico-químicas é um fato esperado, pois desde que a toxicidade é um fenômeno biológico, parece evidente que a resposta biológica deva também ser avaliada. Desta forma, o uso isolado de análises químicas como único recurso de detecção ou a identificação de substâncias químicas e previsão de seus efeitos adversos às comunidades aquáticas se torna praticamente impossível.

Ainda que seja possível obter muitos dados resultantes de testes de toxicidade, deve-se dar importância à sua interpretação. Diferentemente dos dados de propriedades físico-químicas, que são sempre constantes, resultados de testes de toxicidade englobam os fatores que influenciam tanto o agente tóxico como o organismo testado (Rand, 1995). O resultado em si não é o objetivo principal dos testes de toxicidade, mas ele é a base para o ganho de informação toxicológica, que pode ser usada para fazer comparações com outros agentes tóxicos e/ou organismos (Rand, 1995). A aplicação desta informação toxicológica pode ser feita através de modelos.

Rand (1995) comenta que o uso de modelos parece ser um aspecto especializado da toxicologia, mas que na verdade envolve os

testes de toxicidade e sua interpretação. Um modelo é simplesmente uma ferramenta operacional que permite uma aplicação prática de princípios básicos e conceitos. A definição convencional de modelo pode ser puramente conceitual em sua natureza, ou um detalhado algoritmo matemático, ou ainda, algo que está entre estes dois aspectos.

Os modelos matemáticos constituem importantes ferramentas de gestão ambiental. Por sua vez, os modelos existentes que englobam dados de toxicidade, como o AQUATOX e o DREAM, utilizam também outras variáveis como: vazão e profundidade do corpo hídrico, geologia do local atingido, forma de introdução da substância tóxica, dados básicos sobre a emissão e análise físico-química completa da substância analisada (Park et al., 2008; Reed e Hetland, 2002). Esta quantidade de dados pode ser de difícil obtenção, e além disso, algumas variáveis podem não apontar a relação entre organismo e substância tóxica. Ainda, são comumente utilizados para estimar riscos em locais que oferecem perigo de geração de acidentes, ou quando um acidente já aconteceu.

Devido à enorme complexidade dos ecossistemas não é possível obter em detalhes todos os processos relacionados ao comportamento dos poluentes. Estes processos devem ser descritos num apropriado nível de complexidade para dar respostas adequadas para as questões em foco. O nível de complexidade pode variar de caso para caso, mas a meta é fazer um modelo o mais simples quanto possível, englobando todas as variáveis de um dado problema (Schwarzenbach et al., 2006).

Suter (1993) afirma que o uso de modelos unidimensionais, com uma só variável, como por exemplo, a concentração, simplificam a avaliação de risco, porque a resposta é determinada pela importância relativa da concentração de exposição e da concentração efetiva.

O Modelo WTox, desenvolvido por Matias (2002), vem ao encontro das afirmações dos autores citados anteriormente, pois propõe uma avaliação e classificação do risco que substâncias ou compostos potencialmente tóxicos apresentam para os seres vivos. O modelo foi desenvolvido com o objetivo de abordar a relação entre o organismo e o xenobiótico, ou seja, como o indivíduo se comporta diante da exposição a uma substância com potencial tóxico. O efeito tóxico é a variável norteadora do modelo, e ele é observado em nível de efeito global e específico, em organismos representantes de diferentes níveis tróficos. O instrumento matemático utilizado para avaliar esta relação baseia-se na teoria matricial, e sua aplicação se dá através de um software.

No caso de amostras de misturas complexas como resíduos industriais (que estão constantemente trazendo riscos ao ambiente, seja

na geração, no armazenamento dentro da indústria, no transporte até o destino final e mesmo dentro do próprio aterro sanitário), o Modelo WTox mostra-se como uma alternativa para análise de risco ambiental toxicológico. Entretanto, a utilização de um modelo inédito depende de variáveis como a calibração e a validação da metodologia proposta. Para isto, realizou-se um estudo de caso com amostras que justificavam a utilização do método e observou-se os resultados. A calibração foi realizada através da comparação entre os resultados observados com o que foi inicialmente proposto pelo método, avaliando-se os parâmetros analisados e realizando-se o ajuste dos limites propostos para cada parâmetro. A validação foi realizada comparando-se os resultados encontrados com outras metodologias semelhantes. Assim, o presente trabalho teve como objetivo realizar um estudo de caso com amostras de resíduos industriais para calibrar e validar o Modelo WTox, utilizando sete parâmetros toxicológicos para evidenciar efeitos globais e específicos sobre organismos de diferentes níveis da cadeia trófica.

1.1 HIPÓTESES DA PESQUISA

Nos modelos de avaliação de risco existentes, avaliam-se os riscos que um composto químico apresenta ao meio ambiente basicamente por duas linhas de investigação. Uma delas refere-se ao conhecimento das concentrações de um poluente que não causam efeitos adversos na sobrevivência, crescimento ou reprodução e alterações fisiológicas de organismos aquáticos. Outra linha de investigação é a estimativa da concentração esperada do mesmo agente no meio aquático, considerando os dados de produção, transporte, uso, disposição final e principalmente o efeito do agente químico sobre seres vivos. Assim, numa avaliação de risco de um poluente, a aceitabilidade do risco imposto será obtida pela comparação das duas linhas de investigação citadas, ou seja, concentração esperada no ambiente e concentração que não causa efeito aos organismos.

A estimativa da concentração esperada é quase sempre inadequada e de alto custo. Inadequada devido às interações do composto com o meio aquático, podendo sofrer efeitos sinérgicos, aditivos e antagonísticos, induzindo erros na avaliação de risco ambiental. Alto custo, pois, a extração, purificação e dosagem dos compostos de interesse toxicológico quase sempre necessitam de técnicas e aparelhos de alta tecnologia e é evidente que o alto custo configura um obstáculo

para sua utilização. Ainda, dados físico-químicos, geológicos e de hidrologia são difíceis de serem obtidos quando um acidente já aconteceu e quando há necessidade de uma resposta rápida.

1.1.1 Primeira Hipótese

Considerando-se que a predição de toxicidade de misturas complexas não pode ser avaliada apenas por análises físico-químicas, afirma-se que ensaios toxicológicos são os mais adequados para avaliar efeitos adversos destas substâncias aos organismos aquáticos.

1.1.2 Segunda Hipótese

Considerando-se que a correlação entre efeitos toxicológicos nos níveis de toxicidade global e toxicidade específica é o modo mais completo para estudar a toxicidade induzida por compostos químicos, afirma-se que um modelo de avaliação de risco ambiental deve incluir a interação entre os resultados observados nestes dois níveis.

1.1.3 Terceira Hipótese

Considerando-se que a maioria dos modelos preditivos sobre toxicidade e risco ambiental utiliza linhas de investigação onde os dados requeridos não englobam a interação entre os efeitos globais e específicos, e ainda podem ser de difícil obtenção ou de alto custo, afirma-se que o Modelo WTox é o mais adequado para avaliar o risco ambiental toxicológico de poluentes ambientais.

1.2 JUSTIFICATIVA

A intensa atividade industrial vem causando uma crescente poluição e contaminação dos ecossistemas aquáticos, o que acarreta em perigos e riscos para os organismos expostos a esta contaminação. A problemática em se prever riscos de danos consiste no fato de que o sistema de classificação de resíduos industriais no Brasil segue a Norma

NBR 10004 (ABNT, 2004a), e a metodologia deste sistema classifica os resíduos baseando-se principalmente em sua composição físico-química. Diversos estudos comprovam que nem sempre fatores físico-químicos demonstram o potencial tóxico de substâncias químicas, já que estes fatores não traduzem corretamente a relação entre os contaminantes e os seres vivos (Flohr, 2005, 2007; Silva et al., 2011).

Diante disso, e preocupado com o problema da contaminação ambiental, este estudo pretende trazer para a comunidade científica um novo modelo de avaliação de risco ambiental, o Modelo WTox (Matias, 2002). O Modelo WTox, é um modelo que propõe uma avaliação de risco ambiental baseada nos efeitos observados em organismos representativos de diferentes níveis tróficos expostos à substâncias potencialmente tóxicas. Até o momento, poucos estudos propõem avaliações de risco ambiental baseados apenas em variáveis de toxicidade. Além disso, cada um destes modelos emprega parâmetros toxicológicos e organismos variados, e nenhum aplica as mesmas variáveis selecionadas pelo WTox. Os parâmetros considerados pelo Modelo WTox fazem uma correlação entre efeitos globais e específicos em organismos aquáticos, através de testes de toxicidade aguda, testes de toxicidade crônica, e testes de toxicidade para evidenciar efeitos específicos em células e no DNA.

O Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina possui a estrutura do Laboratório de Toxicologia Ambiental – LABTOX que oferece apoio para ensino, pesquisa e extensão na área da toxicologia ambiental. O início das atividades no LABTOX deu-se em fevereiro de 1997, logo após a criação da disciplina de Toxicologia Ambiental em setembro de 1996 (Portaria nº 168/PREG/96). Diversos estudos relacionados à resíduos industriais e preservação ambiental já foram desenvolvidos no laboratório, utilizando metodologias que permitem avaliar os efeitos tóxicos de substâncias complexas nos seres vivos.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo Geral

Aplicar o modelo WTox para realizar uma avaliação de risco ambiental toxicológica em amostras de resíduos industriais.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Analisar os efeitos tóxicos de amostras de resíduos industriais através de ensaios de teste de toxicidade aguda com a bactéria *Vibrio fischeri*;
- Analisar os efeitos tóxicos de amostras de resíduos industriais através de testes de toxicidade aguda e crônica com o microcrustáceo *Daphnia magna*;
- Analisar os efeitos tóxicos de resíduos industriais, através dos métodos da lipoperoxidação de membranas, da metilação biológica do DNA, e da frequência de micronúcleos em peixes *Oreochromis niloticus*;
- Realizar um estudo de caso com amostras de resíduos industriais, utilizando o Modelo WTox através de um software para avaliar e classificar o risco ambiental toxicológico destes resíduos.
- Aplicar os resultados obtidos com o estudo de caso para realizar a calibração e validação do Modelo WTox.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Este tópico engloba breve fundamentação teórica sobre avaliação de risco ambiental, em destaque o Modelo WTox e sua aplicação em amostras de resíduos sólidos industriais. Serão abordados ainda, conceitos sobre os testes de toxicidade propostos pela metodologia do Modelo WTox, assim como sobre os organismos utilizados nestes testes.

2.1 AVALIAÇÃO DE RISCO AMBIENTAL

O termo risco é utilizado na linguagem comum com o significado de “chance de desastre”. Quando utilizado no processo de avaliação de risco ele tem definições específicas, e a mais bem aceita é: “a combinação de probabilidade, ou frequência, ou ocorrência de um perigo definido e a magnitude das consequências destas ocorrências” (Royal Society, 1992, *apud* Fairman et al., 1998).

Risco ambiental é a possibilidade de dano, enfermidade ou morte resultante da exposição de seres humanos, animais ou vegetais a agentes ou condições ambientais potencialmente perigosas (Castro, 1998).

Para Conway (1982) *apud* Brilhante (1999), risco é definido como a medida da probabilidade e da severidade de efeitos adversos. Entre os vários conceitos de risco, um ponto em comum é a inclusão da noção de probabilidade (Brilhante, 1999).

Em toxicologia, risco baseia-se no estudo interativo das ciências exatas (matemática/ estatística), ciências biológicas e sociais, de modo a reduzir o empirismo, as incertezas e as falhas na avaliação de toxicidade de agentes químicos. A toxicologia ambiental, por sua vez, estuda as interações tóxicas de substâncias químicas no ecossistema e sua capacidade de afetar a fisiologia normal de organismos vivos. Assim, risco pode ser definido como a probabilidade medida ou estimada de dano, doença ou morte causada por um agente químico em um indivíduo a este exposto (Caldas, 1999).

Constantemente deparamo-nos com notícias referentes aos riscos que processos industriais ou produtos químicos podem causar a nossa saúde e ao meio ambiente. Milhões de pessoas são expostas todos os dias a estas substâncias em seus locais de trabalho ou residências, na cadeia alimentar, no solo em que pisam, no ar que respiram e nas águas que consomem (Augusto e Freitas, 1998).

Em resposta a essa preocupação, medidas para avaliar e gerenciar riscos ao homem e aos sistemas naturais tornaram-se uma exigência da sociedade internacional. O desenvolvimento de ferramentas que permitam precisar quali-quantitativamente a avaliação dos riscos químicos, físicos e biológicos tornou-se uma prioridade (Hacon, 2003).

A avaliação dos riscos ambientais cresceu e evoluiu desde a década de 1980. Os novos desafios deste processo são, por exemplo, a mudança climática global, a redução de habitat e biodiversidade, e os efeitos de múltiplas substâncias químicas antropogênicas sobre os ecossistemas. Assim, vem ocorrendo um aumento na utilização de avaliações de risco, tornando-se cada vez mais claro que, para atingir o seu potencial como instrumento de gestão, métodos devem ser desenvolvidos para aplicar a avaliação de risco ambiental cada vez mais frequentemente, e em escalas mais complexas (Hope, 2006).

A avaliação dos riscos é vista cada vez mais como uma forma de integrar a ciência, a política e a gestão para responder à enorme quantidade de problemas ambientais (CENR, 1999). Pedrozo et al. (2002) definem avaliação de risco como o processo de estimativa da probabilidade de ocorrência de um evento associado à magnitude de efeitos adversos em função do tempo. Para Caldas (1999), a avaliação de risco é o primeiro passo no desencadeamento de processos decisórios, e advém do conhecimento da relação causa-efeito e de possíveis danos ocasionados pela exposição a um determinado agente químico.

De acordo com a U.S.EPA (1998), avaliação de risco ambiental é definida como o processo que analisa a probabilidade de ocorrência de efeitos adversos em um ecossistema como resultado da exposição a um ou mais agentes estressores. O termo estressor é definido como qualquer fator físico, químico ou biológico capaz de induzir a um efeito adverso. Efeitos ambientais adversos englobam uma série de implicações que variam desde mortalidade de um organismo até a perda de função de um ecossistema.

Na avaliação de riscos ambientais, os riscos são avaliados para diferentes ambientes e em níveis tróficos diversos, população ou comunidade, com o objetivo de proteção do ecossistema como um todo (Zagatto, 2006b). Nas agências regulatórias OECD (*Organization for Economic Cooperation and Development*) e U.S.EPA (Agência de Proteção Ambiental dos EUA) o uso de organismos aquáticos de diferentes níveis tróficos como algas, microcrustáceos e peixes já é obrigatório nos estudos ecotoxicológicos para análise de risco ambiental (Robbens, 2007).

Para estruturar a análise de muitos tipos de riscos, Brilhante (1999) apresenta o Modelo Geral do Risco desenvolvido por Bibo e Lemkowitz em 1994. Este modelo foi modificado por Matias (2002), onde foi introduzida a variável “modelo toxicológico”. Desta maneira, o modelo adaptado pode ser chamado de Modelo Geral de Risco Ambiental (Figura 1). O início acontece com o termo Fonte, que é a origem de uma emissão de algo indesejável (massa e/ou energia). Estas fontes podem ter diversas origens: naturais, acidentes ou atividades normais como, manufatura industrial, tráfego rodoviário, agricultura, produção de eletricidade, entre outras. As fontes emitem substâncias que geram efeitos adversos. As emissões ocorrem em um ou mais compartimentos ambientais – ar, água ou solo – e interagem entre si.

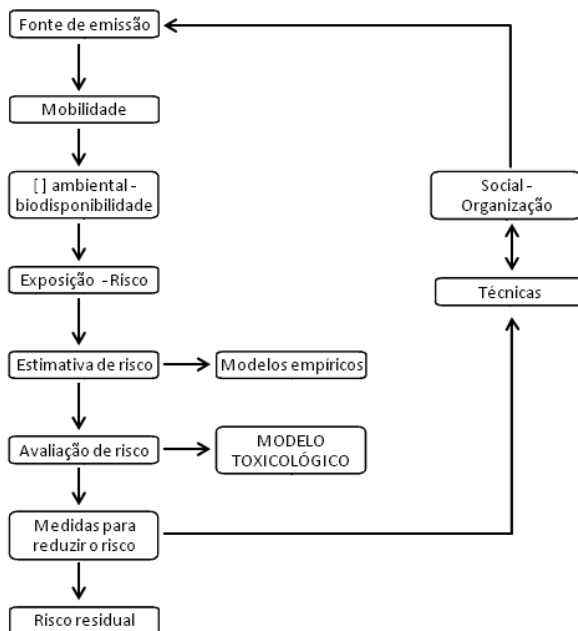


Figura 1 – Adaptação do Modelo Geral de Risco Ambiental.
Fonte: Matias (2002).

De acordo com Brilhante (1999), após a emissão de poluentes, ocorre o transporte. Os modelos de transporte buscam estimar a intensidade e a duração da exposição, resultante da emissão para o compartimento ambiental em razão de parâmetros de emissão. Estes

compreendem: taxa e tamanho da exposição; forma da fonte; posição da fonte; tamanho e densidade das partículas; distância entre a fonte emissora e os alvos; condições de clima; condições da topografia; composição química e reações entre a atmosfera e os poluentes; entre outros.

Ainda segundo Brilhante (1999), transporte corresponde a movimento, e quase sempre acontece ligado à procedimentos de mistura e diluição, algumas vezes com reações químicas. Por isso, as concentrações dos poluentes diminuem com o aumento da distância das fontes de emissão, reduzindo-se assim o nível das concentrações ambientais.

O termo exposição significa o contato de um estressor (agente físico, químico ou biológico) com um receptor (Yu, 2005). O risco resulta da combinação da exposição com os efeitos observados no receptor (Yu, 2005). O principal componente da caracterização de risco é a integração dos resultados da avaliação da exposição e a avaliação dos efeitos para obtenção uma estimativa do nível de efeitos que vão resultar da exposição (Suter, 1993).

A magnitude da ocorrência do risco não está relacionada somente ao grau da exposição, mas também do tamanho da população-alvo (Brilhante, 1999). Quando todas as etapas vinculadas ao evento poluidor (emissão, transporte, concentração, exposição) tenham sido analisadas, deve-se proceder à estimativa do risco (Brilhante, 1999).

Além da estimativa do risco, considerado no modelo adaptado como empírico (Figura 1), entende-se que existe a necessidade de realizar uma avaliação do risco baseada em parâmetros toxicológicos para que o resultado seja mais preciso, já que considera todas as perspectivas geradas pela amplitude que tais parâmetros oferecem. Desta forma, Matias (2002) fez uma adaptação, e acrescentou a variável toxicológica como parte integrante do Modelo Geral de Risco Ambiental.

Conforme Brilhante (1999), o processo de avaliação tem como objetivo definir se o risco é ou não aceitável. Assim, este processo envolve uma análise ética que é baseada em questões normativas. Existem casos em que decisões de políticas ou normas são amparadas nos resultados desses estudos, que consideram ainda, as questões econômicas.

Se um risco é avaliado como aceitável, não há necessidade de se adotar outras medidas, caso contrário, medidas de ordem social e técnica devem ser tomadas (Brilhante, 1999). Medidas de ordem social abrangem mudanças nas leis, nos padrões, acordos entre governo e as

indústrias, etc. Estas medidas decorrem de mudanças de atitudes e percepções (Brilhante, 1999). As medidas de ordem técnica, podem ser entendidas como novos métodos para avaliação de risco. Neste sentido, Robbens (2007) afirma que, para regular a produção e uso de químicos industriais, procedimentos científicos de avaliação de risco estão sendo estabelecidos em níveis nacional e internacional. A nova legislação europeia (REACH) e a Diretiva para Uso da Água (WFD) nos Estados Unidos e em outros lugares do mundo estão fomentando a demanda por informação toxicológica para uma grande diversidade de espécies, e ilustrando o crescimento da sensibilização da sociedade e da política para este tipo de risco.

A toxicologia computacional é uma área de pesquisa em crescimento, que está integrando os avanços em biologia molecular e química com a modelagem e a ciência computacional, no sentido de aumentar o poder de previsões no campo da toxicologia (Kavlock et al., 2007). O sucesso nesta área pode traduzir com maior eficiência a determinação dos perigos de diversos estressores ambientais, que devem ser monitorados e, a partir disto, pode-se decidir quais os tipos de informação são as mais necessárias para diminuir incertezas na proteção da saúde humana e do meio ambiente (Kavlock et al., 2007).

De acordo com Mackay e Paterson (1993) existem basicamente três tipos de modelos de avaliação de risco disponíveis: 1) modelos multimídia, que descrevem como uma substância química se comporta no sistema “ar-água-solo-sedimento-biota”; 2) modelos de remediação, que descrevem os efeitos químicos no entorno de uma área contaminada; e 3) modelos que descrevem o comportamento de substâncias químicas em compartimentos únicos como lagos, solos, atmosfera e cadeia alimentar. Alguns exemplos destes modelos são citados a seguir:

- Modelos multimídia: GEOTOX (McKone e Layton, 1986); SMCM (Cohen et al., 1989, 1990); Enpart (OECD, 1989); Toxscreen (Hetrick e McDowell-Boyer, 1983).
- Modelos de remediação: AERIS (Senes Consultants, 1989); RAPS (Whelan et al., 1987).
- Modelos para compartimentos únicos: EXWAT (OECD, 1989); QWASI (Mackay et al., 1983); SESOIL (OECD, 1989); POSSM (Brown e Silver, 1986).

Conforme Fairman et al. (1998), a Agência de Proteção Ambiental Europeia – EEA – classifica os modelos computacionais de avaliação de risco de uma forma um pouco diferente, mas também em três categorias: 1) modelos de avaliação de risco e gestão; 2) modelos de

avaliação de exposição/ transporte/efeitos; e 3) modelos de avaliação de identificação/ distribuição de perigo. Ainda de acordo com a EEA, estes modelos podem não ser de fácil compreensão, e provavelmente existem mais de 500 modelos em todo o mundo.

Um exemplo de modelo de avaliação de risco que pode ser classificado como de multimídia e de avaliação de efeito é o DREAM (Reed e Hetland, 2002), um modelo tridimensional que analisa o transporte, a exposição, a dose e os efeitos de diversos poluentes, inclusive misturas complexas. Cada componente é descrito por um conjunto de parâmetros toxicológicos e físico-químicos, e incorpora os processos que regem o comportamento de poluentes na coluna d'água. A exposição, absorção, depuração e efeitos observados em peixes e no zooplâncton são computados simultaneamente com os dados físico-químicos e de transporte. Um balanço de massa representa a fração de cada componente químico que está associado aos efeitos observados nos organismos. Apesar de ser um modelo que analisa a toxicidade de misturas complexas apenas em organismos aquáticos, ele pode ser de difícil operação, já que são necessários dados físico-químicos e de emissão do poluente analisado.

Um outro modelo de avaliação que também pode ser considerado como de multimídia e de avaliação de efeito é o AQUATOX (Park et al., 2008) que opera combinando base de dados com algoritmos, e pode avaliar efeitos diretos e indiretos de vários estressores ambientais incluindo nutrientes, resíduos orgânicos, sedimentos, químicos orgânicos tóxicos, fluxo e temperatura em ecossistemas aquáticos. Este modelo conta ainda com um submodelo ecotoxicológico que computa toxicidade aguda e crônica, efeitos letais e subletais. Contudo, este modelo conta apenas com 60 tipos de substâncias químicas em sua biblioteca. Apesar de os usuários poderem acrescentar dados de novas substâncias químicas ao sistema, entende-se que este número ainda é pouco representativo face à quantidade de substâncias químicas que são introduzidas a cada dia nos ecossistemas aquáticos. Ainda, no submodelo ecotoxicológico, avaliam-se apenas efeitos agudos e crônicos, não sendo dado o devido valor aos efeitos genotóxicos para o organismo.

O CREAM (Grimm et al., 2009) é um modelo de análise de risco ambiental toxicológico que ainda está em fase de desenvolvimento e que se mostra bastante complexo. Envolve questões associadas com a recuperação das populações afetadas, extrapolações de indivíduo para população e até mesmo entre espécies, sensibilidade entre os diferentes organismos-teste, doses subletais, e ainda, o nível de complexidade que

o modelo deve ter para compreender questões envolvendo diferentes tipos de análise de risco. Mesmo que este modelo apresente uma metodologia diferente e talvez mais completa de avaliação de risco ambiental toxicológico, ainda assim, os efeitos no organismo limitam-se à concentrações subletais.

Tigini et al. (2011), propôs uma metodologia para avaliar toxicidade, genotoxicidade e risco ambiental de resíduos da indústria têxtil. A metodologia sugere a utilização de testes de toxicidade com organismos de diferentes níveis tróficos como bactérias, plantas aquáticas e terrestres e microcrustáceos. Na avaliação de risco proposta por Tigini et al (2011), utiliza-se basicamente os dados de CE_{50} observados em cada teste de toxicidade. Estes dados são transformados em um índice que representa a toxicidade relativa do teste (TR), e em seguida este dado é incluído em outra fórmula que engloba todos as TR e as transforma em um índice que representa a toxicidade da bateria de testes (TRB). De acordo com a porcentagem de toxicidade encontrada no índice TRB é possível classificar o risco ambiental da amostra. Ainda que esta metodologia consiga integrar resultados de diferentes testes de toxicidade, classificando o risco com base nestes valores, apenas a toxicidade aguda é observada.

Piva et al. (2011) desenvolveram uma metodologia que fornece uma classificação de periculosidade de sedimentos através da avaliação de diversos parâmetros toxicológicos e ao final integra todos. Nesta metodologia, a avaliação do perigo se dá por quatro linhas de evidência, que são: 1) características químicas do sedimento; 2) biodisponibilidade em peixes; 3) biomarcadores e 4) bioensaios em laboratório. A integração é realizada de acordo com os resultados observados em cada linha de evidência. Esta metodologia considera diversos parâmetros toxicológicos importantes, mas a caracterização química do sedimento é necessária.

O Índice PEEP (*Potential Ecotoxic Effects Probe*) foi concebido por Constan (1993), para avaliar e comparar o potencial ecotóxico de efluentes e resíduos industriais. Esta metodologia utiliza uma escala de 0 a 10 para classificar o perigo de um poluente industrial e uma bateria de ensaios toxicológicos e de genotoxicidade. Ainda, requer a utilização da variável vazão (m^3/h), e considera a biodegradabilidade da amostra. O método PEEP utiliza basicamente a concentração de efeito não observado (CENO) e a menor concentração de efeito observado (CEO) da amostra em cada teste e transforma este dado em uma unidade tóxica, que é posteriormente incluído em uma equação que engloba o somatório das unidades tóxicas e o valor da

vazão da amostra. O índice PEEP é representado pela letra P, em uma fórmula que articula todos os dados encontrados nos testes de toxicidade e a vazão. A necessidade de se conhecer a vazão de emissão e a biodegradabilidade da amostra são um entrave, já que são requeridos outros dados além da variável toxicidade.

Segundo Robbens et al. (2007), a avaliação dos riscos ecotoxicológicos há muito tem sido baseada apenas sobre o efeito agudo e a concentração efetiva ou letal (CE/CL₅₀) em organismos de diferentes níveis tróficos. Estes testes são insuficientes para avaliar adequadamente o risco associado com vários produtos químicos. A introdução de avançadas técnicas moleculares levaria à uma avaliação de risco mais adequada.

Baseando-se nos modelos de análise de risco ambiental toxicológico descritos anteriormente, e na afirmação de Robbens et al. (2007), pode-se concluir que o Modelo WTox seria um método mais adequado para avaliar o risco ambiental toxicológico para misturas complexas, pois além de avaliar os efeitos agudos e concentrações letais, o método inclui variáveis de toxicologia crônica, que permitem identificar efeitos na reprodução, e de toxicologia específica, que permitem identificar efeitos na célula e no DNA dos organismos testados.

2.2 MODELO WTox

O modelo WTox, desenvolvido por Matias (2002) é um modelo de avaliação e classificação de risco ambiental, e seu fundamento é baseado no resultado do estudo da relação entre o organismo e misturas complexas, abordando parâmetros da toxicologia global e específica. O instrumento matemático aplicado no modelo para avaliar esta relação baseia-se na teoria matricial.

2.2.1 Variáveis do Modelo WTox

Na concepção inicial do modelo desenvolvido por Matias (2002), as variáveis toxicológicas selecionadas foram:

- Toxicidade aguda em *Daphnia magna* (CE₅₀ 48 h);
- Toxicidade crônica - Estudo de reprodução em *Daphnia magna* (Taxa nº de neonatos - %);
- Toxicidade aguda em *Vibrio fischeri* (CE₅₀ 30 min.);

- Lipoperoxidação (dosagem do MDA - %);
- Metilação biológica do DNA (dosagem da m⁵dC - %);
- Teste do Cometa (danos no núcleo da célula, % comparada ao controle).
- Frequência de Micronúcleo (número de micronúcleos em 2000 células analisadas).

A metodologia do Modelo WTox permite a inclusão ou exclusão de variáveis toxicológicas, portanto, no presente trabalho, optou-se por excluir o Teste do Cometa.

2.2.2 Matriz de risco

Para identificação de riscos, o modelo propõe a utilização dos princípios da Matriz de Leopold. O princípio básico da Matriz de Leopold consiste em, inicialmente, apontar todas as possíveis interações entre situações e fatores, para, em seguida, estabelecer em escala (números), a magnitude e importância de cada impacto, identificando-o como positivo ou negativo (Costa et al., 2005). A valoração da magnitude é relativamente objetiva ou empírica, pois se refere ao grau de alteração provocado pela ação sobre o fato ambiental, enquanto que a pontuação da importância é subjetiva ou normativa, pois envolve atribuição de peso relativo ao parâmetro afetado (Costa et al., 2005).

De acordo com Costa et al. (2005), a teoria matricial é uma ferramenta frequentemente utilizada em avaliações de impacto ambiental. As matrizes de interações são técnicas bidimensionais que contrapõem ações com fatores ambientais. Uma das mais difundidas nacional e internacionalmente, é a Matriz de Leopold, elaborada em 1971 para o Serviço Geológico do Interior dos EUA (Costa et al., 2005).

Assim, na matriz de risco elaborada para o Modelo WTox, são identificados locais onde ocorrem eventos de alta gravidade, locais onde é prudente realizar ações de gerenciamento de risco, e locais onde as condições são aceitáveis. Com estas características, o estudo matricial mostra-se uma ferramenta eficiente, pois possibilita analisar efeitos toxicológicos complexos e suas implicações a partir de números, facilitando a avaliação do risco ambiental.

A matriz de risco proposta nesta metodologia faz a combinação de parâmetros toxicológicos (níveis de toxicidade) com os de gravidade dos riscos, e pode ser visualizada na Figura 2.

Parâmetro Toxicológico	A	5	10	15	20
	B	4	8	12	16
	C	3	6	9	12
	D	2	4	6	8
	E	1	2	3	4
		IV	III	II	I
Gravidade					

Figura 2 – Matriz de riscos - correlação entre o parâmetro toxicológico (graus de toxicidade) com a gravidade induzida pelo xenobiótico.

2.2.3 Níveis de Toxicidade

Para estabelecer os graus de toxicidade propostos neste modelo foram definidos cinco níveis, que representam os intervalos das taxas de cada parâmetro toxicológico e sua classificação (Quadro 1).

Nível	Taxas	Classificação
A	(*)	Extremamente Tóxico
B	(*)	Altamente Tóxico
C	(*)	Mediamente Tóxico
D	(*)	Pouco Tóxico
E	(*)	Não Tóxico ou Toxicidade Branda

Quadro 1 – Níveis dos possíveis resultados aplicados na matriz de risco.

Nota: (*) Substituir pelas taxas do Quadro 2.

Cada parâmetro toxicológico proposto para o modelo possui seus intervalos de taxas específicos (Quadro 2). Na fase de concepção do Modelo, os intervalos foram adotados para cada parâmetro, a partir dos resultados obtidos nas pesquisas desenvolvidas no Laboratório de Toxicologia Ambiental da UFSC, no Laboratório de Toxicologia da Universidade de Bordeaux (França), e em publicações correlatas. A base de dados utilizada para a definição dos limites de cada intervalo é apresentada no Apêndice 1.

Parâmetros Toxicológicos							
Nível	CE ₅₀	Reprodução (+)	Reprodução (-)	m ⁵ dC (+)	MDA (+)	Micronúcleo	Cometa
A	< 5	> 100	80 – 100	>100	>80	> 20	>100
B	5 - 10	60 – 100	50 – 80	70 – 100	60-80	10 – 20	80-100
C	10 - 30	30 – 60	20 – 50	30-70	30-60	5 – 10	60-80
D	30 - 60	10 – 30	10 – 20	10-30	10-30	2 – 5	20-60
E	60-100	0 – 10	0 – 10	0 – 10	0 – 10	0 – 2	0 – 20

Quadro 2 – Intervalo de taxas dos parâmetros toxicológicos, conforme proposto por Matias (2002).

Notas: 1 - Dependendo das características do composto a taxa de reprodução pode aumentar (+) ou diminuir (-). 2 - Os níveis para o parâmetro CE₅₀ são utilizados para testes agudos com *Daphnia magna* e *Vibrio fischeri*.

A identificação de perigos tem por objetivo apontar os possíveis eventos indesejáveis que podem levar à materialização de um perigo, para que sejam determinadas as hipóteses acidentais que acarretarão consequências significativas. A Análise Preliminar de Perigos – APP, é uma técnica que teve origem no programa de segurança militar do Departamento de Defesa dos EUA. Na APP devem ser identificados os perigos, as causas e os efeitos (consequências) e as categorias de severidade correspondentes (CETESB, 2008).

No Modelo WTox, as categorias de gravidade podem ser comparadas às categorias de severidade de uma APP, entretanto, neste caso, cada categoria de gravidade (Quadro 3) representa as observações comportamentais e fisiológicas dos reativos biológicos durante os testes, e são definidas pelo profissional que realiza o estudo.

Gravidade	Descrição	Definição
I	Super Crítica	Alterações fisiológicas irreversíveis causando morte celular ou do organismo, influenciando na cadeia trófica e consequentemente acarretando um desequilíbrio ecológico
II	Crítica	Alterações fisiológicas irreversíveis sem morte celular ou do organismo, porém induzindo patologias crônicas que poderão influenciar no sistema reprodutivo, gerar mutantes, alterações na célula e no DNA.
III	Marginal	Alterações fisiológicas reversíveis. Não ultrapassam a capacidade de reparação do organismo.
IV	Desprezível	Alterações fisiológicas pouco importantes

Quadro 3 – Categorias de gravidade.

Se outros dados, tais como vazão do efluente, vazão do corpo receptor ou comportamento do composto no meio ambiente estiverem disponíveis, isto poderá influenciar o enquadramento da substância analisada em determinada categoria de gravidade. Assim, a experiência do profissional que realiza o estudo é um fator fundamental para determinar à qual categoria de gravidade a substância pertence.

2.2.4 Classificação do risco para cada parâmetro aplicado

Analisando a matriz de risco proposta para o modelo (Figura 2), verifica-se que, na medida em que se aumenta o grau da relação Parâmetro Toxicológico X Gravidade, acontece um aumento numérico proporcional na matriz. Para classificar estes valores o método sugere o seguinte enquadramento:

- **Risco Crítico:** ≥ 9
- **Risco Significativo:**] 9 – 6]
- **Risco Reduzido:**] 6 – 4]
- **Risco Marginal:** < 4

O Quadro 4 demonstra as correlações entre o nível de toxicidade encontrado para cada parâmetro toxicológico e a gravidade, resultando na classificação de risco.

Nível de Toxicidade	Gravidade	Risco
A B C	I, II ou III I ou II I ou II	Crítico
B C D	III II ou III I ou II	
A B C D E	IV IV III ou IV II, III ou IV I, II, III ou IV	
B C D E	IV IV III ou IV I, II, III ou IV	Marginal

Quadro 4 – Classificação de risco.

2.2.5 Confirmação do risco pela avaliação cruzada entre os parâmetros

Ao estimar-se o risco de um composto para o meio aquático, a partir de um dos parâmetros toxicológicos proposto pelo método, tem-se uma boa noção do risco. Porém ao analisar somente um parâmetro toxicológico, pode-se estar cometendo erros de classificação de risco. O principal motivo desta possibilidade está nas diferenças dos mecanismos de ação tóxica.

Assim, o método só terá validade se forem feitos um teste para evidenciar efeitos agudos, um para evidenciar efeitos crônicos e um para evidenciar efeitos genotóxicos.

De posse dos resultados faz-se o cruzamento das informações para uma avaliação de risco definitiva. Um exemplo do cruzamento dessas informações é mostrado no Quadro 5. Os passos para a realização deste cruzamento são:

1) Com os resultados dos testes toxicológicos (toxicidade aguda e crônica, genotoxicidade), verificar o risco e assinalar com sinal (+) no quadro pertinente.

2) Cada parâmetro ou risco possui um peso (estipulado para o modelo); estes pesos são multiplicados e o valor deve ser colocado nos quadros da pontuação. O peso 1 para toxicidade aguda se justifica pela facilidade de detectar o efeito no tempo, sendo possível tomar medidas rápidas em relação à fonte causadora de toxicidade. Chasin e Azevedo (2003) afirmam que em curto prazo, a absorção do agente tóxico é instantânea, a dose é única e as manifestações da intoxicação se desenvolvem rapidamente. A morte ou a cura ocorrem sem demora (Chasin e Azevedo, 2003). O peso 2 para toxicidade crônica e genotoxicidade se justifica pela dificuldade de detectar o efeito no tempo, consequentemente, é mais difícil tomar medidas em relação à fonte causadora da toxicidade. Villela et al. (2003) consideram que substâncias tóxicas que induzem efeitos crônicos produzem danos em longo prazo, reduzindo a sobrevivência dos organismos, influenciando na sua reprodução, ou ainda, alterando o patrimônio genético. Por isto é necessária uma ação preventiva, já que a detecção de uma fonte de atividade genotóxica e/ou carcinogênica pode ocorrer somente após muitos anos (Villela et al., 2003).

3) A soma dos pontos de cada quadro representa o valor numérico que deve ser analisado segundo o seguinte enquadramento de classificação de risco ambiental:

- **Risco Crítico: 16 a 20**
- **Risco Significativo: 15 a 11**
- **Risco Reduzido: 6 a 10**
- **Risco Marginal: 1 a 5**

Parâmetro	Classificação			
	Risco Marginal (Peso 1)	Risco Reduzido (Peso 2)	Risco Significativo (Peso 3)	Risco Crítico (Peso 4)
Toxicidade Aguda (Peso 1)	x			
Toxicidade Crônica (Peso 2)				x
Genotoxicidade (Peso 2)		x		
Pontuação	1	4		8

Quadro 5 – Exemplo de utilização do cruzamento de informações.

Neste exemplo, a soma da pontuação seria igual a **13** (1 + 4 + 8), e a substância seria classificada como de Risco Ambiental Significativo.

2.3 RESÍDUOS SÓLIDOS INDUSTRIAIS

Resíduos sólidos industriais são misturas complexas, compostas de diversas substâncias tóxicas, que podem se bioacumular nos organismos e atingir o homem através da cadeia trófica (Sisino, 2003). Mesmo que cada um destes compostos esteja presente em baixas concentrações, a sinergia e a adição entre substâncias podem potencializar os efeitos tóxicos das misturas (Schwarzenbach et al., 2006).

Segundo a Norma Brasileira NBR 10004 (ABNT, 2004a), resíduos sólidos são os resíduos nos estados sólido e semi-sólido, que resultam de atividades de origem industrial, doméstica, hospitalar, comercial, agrícola, de serviços e de varrição. De acordo com suas características, determinadas conforme os procedimentos da NBR 10004 os resíduos são classificados em Classe I (resíduos perigosos) ou Classe II (resíduos não-perigosos). Resíduos Classe I apresentam pelo menos uma das seguintes características: inflamabilidade, corrosividade, toxicidade, reatividade ou patogenicidade. Resíduos Classe II são divididos em: 1) classe II A (não inertes) e podem ter propriedades como biodegradabilidade, combustibilidade ou solubilidade em água; e 2) classe II B (inertes), resíduos que não apresentam solubilidade em água.

2.3.1 Indústrias e Resíduos Industriais em Santa Catarina

Em Santa Catarina a economia industrial é caracterizada pela concentração em diversos pólos, o que confere ao Estado padrões de desenvolvimento equilibrado entre suas regiões: cerâmico, carvão e descartáveis plásticos no Sul, alimentar no Oeste, têxtil e cristal no Vale do Itajaí, metal-mecânico e mobiliário no Norte, madeireiro, papel e celulose na região Serrana e tecnológico na Capital. Embora haja essa concentração por regiões, muitos municípios estão desenvolvendo vocações diferenciadas, fortalecendo vários segmentos de atividade (FIESC, 2010).

A produção dos setores têxtil, metal-mecânico e de papel e celulose é de grande destaque. De acordo com os dados disponibilizados pela FIESC (2010), no setor têxtil, Santa Catarina abriga a maior empresa brasileira e a segunda do mundo na fabricação de camisas de malha. O Estado é o maior exportador do país de roupas de toucador/cozinha, de tecidos atalhados de algodão e de camisetas *T-Shirt* de malha. E ainda, é líder da América Latina na produção de fitas elásticas. No setor metal-mecânico, o Estado possui a maior fundição independente do Brasil, da América Latina e a quinta em nível mundial, especializada na fabricação de produtos fundidos para a indústria automotiva. O Estado também é líder nacional em eletroferragens galvanizadas a fogo para distribuição de energia elétrica, telefonia e TV a cabo, além de elementos de fixação (parafusos, porcas etc.). No setor de papel e celulose, o Estado é o maior exportador de papel/cartão *Kraftliner* para cobertura do Brasil. É líder nos mercados de papéis e cartões para embalagens, embalagens de papelão ondulado e sacos industriais. Além disso, em Santa Catarina está situada a maior produtora, exportadora e recicladora de papéis do Brasil (FIESC, 2010).

Sabendo-se que estas indústrias geram grandes quantidades de produtos, pode-se afirmar que a quantidade de resíduos industriais gerados é também muito elevada. Estes resíduos possuem importante potencial poluidor, pois apresentam em sua composição diversas substâncias tóxicas, como cromo, alumínio, cádmio, chumbo, cromo, ferro, níquel, zinco, fenóis e dioxinas (Rosa et al., 2007; Chandra et al., 2005; Jha et al., 2001; Chen et al., 2001; Kostamo et al., 2003).

2.3.2 Tratamento, Disposição Final e Gerenciamento de Resíduos Industriais

No Brasil, o tratamento e a disposição final dos resíduos industriais ainda é um problema muito sério. De acordo com dados do IBGE (2002), são produzidas diariamente quase 230000 toneladas de resíduos, sendo que deste total, cerca de 140000 correspondem a resíduos industriais.

Existem diversos tipos de tratamento de resíduos, por exemplo, estabilização e solidificação, encapsulamento e incineração. A disposição final de resíduos geralmente é feita em aterros sanitários industriais (Lora, 2000). Na Figura 2.3 é possível visualizar o Aterro Industrial e Sanitário de Blumenau - SC, e suas unidades de tratamento de resíduos e efluentes e disposição final de resíduos industriais Classe I e II.



Figura 3 – Aterro Industrial e Sanitário de Blumenau – SC.
Fonte: MEA - Momento Engenharia Ambiental (2003).

Ainda que os resíduos tenham um destino final correto, sempre existirão riscos. O manuseio, o acondicionamento, o armazenamento e o transporte destes materiais são etapas que necessitam de atenção. Ainda, não se podem descartar problemas quanto à impermeabilização do solo do aterro, resíduos quimicamente incompatíveis, e até mesmo fenômenos naturais imprevisíveis.

Diante destas características torna-se indispensável um programa de gerenciamento de resíduos sólidos. Este gerenciamento implica em ações que vão além do simples cumprimento de leis e regulamentações ambientais (Lora, 2000). A diminuição de riscos e de geração de resíduos são questões significativas que devem ser

consideradas. Para haver um gerenciamento de resíduos é necessário o conhecimento do processo de geração e da caracterização do resíduo. Entretanto, os métodos analíticos tradicionais, desenvolvidos para substâncias químicas puras, apresentam-se inadequados para a análise das misturas de resíduos heterogêneas e/ou complexas. Em todo o mundo esforços têm sido feitos para adaptar ou desenvolver procedimentos de amostragem e analíticos apropriados (Lora, 2000).

Neste sentido, a análise toxicológica de resíduos complexos, que podem causar efeitos sinérgicos e aditivos, apresenta-se como uma importante aliada na avaliação de risco e tomada de decisão num processo de gestão ambiental.

2.4 TOXICOLOGIA GLOBAL: TOXICIDADE AGUDA E CRÔNICA

A toxicologia global caracteriza-se por evidenciar efeitos toxicológicos no organismo como um todo, sem causa definida. Estes modelos toxicológicos são chamados bioindicadores de efeito. A falta de apetite, alteração na taxa de absorção de oxigênio, dificuldades motoras, diarreias, influência na reprodução, etc., são efeitos observados nos ensaios da toxicidade global. A mortalidade é uma das variáveis que fornece uma indicação global do impacto tóxico da substância testada, sem definir a causa do efeito.

Toxicidade é a capacidade que uma substância tem de causar danos a um sistema biológico. Entretanto, não é apenas a presença de um composto que produz um efeito tóxico, mas as relações entre a dose à que o organismo está exposto e seus efeitos biológicos, que determinam qual concentração pode causar danos (Landis e Yu, 2003).

Para avaliar a toxicidade de agentes químicos no meio hídrico é necessário realizar ensaios toxicológicos com organismos representativos de diferentes níveis tróficos do ecossistema aquático. O conhecimento da toxicidade de substâncias químicas em diferentes organismos possibilita estabelecer limites permissíveis destas substâncias para a proteção da vida aquática e avaliar o impacto que estes poluentes causam. Permite ainda estabelecer e avaliar critérios e padrões de qualidade das águas (Aragão e Araújo, 2006).

Ao longo dos anos uma série de métodos para testes de toxicidade foi sendo padronizada. Estes métodos estão disponíveis nas seguintes associações ou organizações de normatização como *American Society for Testing and Materials (ASTM)*, *Organization for Economic*

Cooperation and Development (OECD), United States Environmental Protection Agency (U.S.EPA), Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), Association Française de Normalisation (AFNOR), American Water Works Association (AWWA), Deutsches Institut für Normung (DIN) e International Organization for Standardization (ISO) (Landis e Yu, 2003; Aragão e Araújo, 2006).

Os resultados dos testes de toxicidade em organismos aquáticos funcionam portanto, como instrumentos capazes de alertar para um sério problema ambiental, que é a introdução de substâncias tóxicas em corpos d'água. Assim, de acordo com os princípios do Modelo WTox, testes de toxicidade aguda e crônica foram selecionados para avaliar e classificar o risco ambiental de poluentes. As características de cada um dos testes são apresentadas nos itens a seguir.

2.4.1 Ensaios de Toxicidade Aguda

Os testes de toxicidade aguda podem ser definidos como aqueles que avaliam os efeitos sofridos pelos organismos expostos a agentes químicos em curto período de exposição (até 96 horas). É um teste tipicamente associado à destruição dos tecidos ou de sistemas fisiológicos a uma velocidade que supera a velocidade de reparação ou de adaptação, geralmente levando à letalidade. O efeito agudo frequentemente está associado a acidentes ambientais. De acordo com Frello (1998), o teste de toxicidade aguda evidencia uma situação, mas não identifica a sua causa.

O teste de toxicidade aguda envolve a determinação de uma dose letal média (DL_{50}) ou de uma concentração efetiva média (CE_{50}), que são as concentrações em que se observam letalidade ou efeitos em 50% da população exposta à amostra analisada. Essa é a resposta considerada significativa para ser extrapolada a uma população (Bassoi et al., 1990). Conforme Lu (1996), tais estudos também podem promover o estabelecimento das doses ou concentrações a serem usadas nos estudos mais prolongados.

Na ecotoxicologia, nos estudos do efeito agudo de produtos potencialmente tóxicos ao meio ambiente são utilizados organismos-teste como peixes, microcrustáceos e algas, por serem sensíveis e representarem diferentes níveis tróficos (Matias, 2005).

O teste de toxicidade aguda com *Daphnia magna* pode ser aplicado para várias amostras ambientais (efluentes líquidos industriais ou domésticos, lixiviados de resíduos sólidos, águas continentais

superficiais ou subterrâneas) e de substâncias químicas solúveis ou estáveis nas condições de teste. Consiste na exposição de indivíduos jovens de *Daphnia magna* a várias diluições do agente-teste por um período de 24 ou 48 horas, onde o efeito agudo é determinado através da imobilidade dos organismos. Para representar o resultado utiliza-se a CE₅₀ (concentração efetiva de uma substância que causa a imobilidade de 50% dos organismos expostos a ela).

O teste de toxicidade aguda com a bactéria *Vibrio fischeri* pode ser utilizado tanto para amostras de água doce quanto salina. É um ensaio de fácil execução, e consiste na medição da luminescência emitida pelas bactérias após exposição a uma amostra por um período de 15 ou 30 minutos. Na presença de substâncias tóxicas a bioluminescência enfraquece, sendo a quantidade de perda de luz proporcional à toxicidade da amostra. A diminuição da luminosidade acontece em função da inibição dos processos metabólicos das bactérias (Knie e Lopes, 2004).

O teste de inibição de luminescência com *Vibrio fischeri* é um excelente método para estimar a toxicidade de diferentes substâncias químicas e efluentes. Os resultados são comparáveis com outros testes de toxicidade aguda, e o teste é padronizado pela ISO 11348-3 (1998) para amostras de água e efluentes (Lappalainen, 2001).

Por proporcionarem resultados rápidos e serem amplamente utilizados em pesquisas toxicológicas, estes dois testes foram escolhidos como parâmetros para o modelo de risco ambiental WT_{ox}.

2.4.2 Ensaios de Toxicidade Crônica

O teste crônico é importante e complementar ao teste agudo, pois a ausência de efeito agudo não caracteriza ausência de efeitos dissimulados sobre a biota (Brentano, 2006).

O efeito crônico se traduz pela resposta a um estímulo que continua por longo tempo, geralmente períodos que podem abranger parte ou todo o ciclo de vida dos organismos. De modo geral, porém não exclusivo, estes efeitos são subletais e são observados em situações em que as concentrações do agente tóxico permitem a sobrevivência do organismo, embora afetem uma ou várias de suas funções, tais como reprodução, desenvolvimento de ovos, crescimento e maturação, etc. Para avaliar esses efeitos utilizam-se testes de toxicidade crônica, nos quais é determinada a concentração do agente tóxico que não causa

efeito observado (CENO – Concentração de Efeito Não Observado) (Basso et al., 1990).

Em ecotoxicologia, existe uma convenção de que um teste crônico deve abranger pelo menos 10% do ciclo de vida da espécie observada (Suter, 1993 *apud* Newman e Unger, 2000). Villarroel et al. (2000) comenta que os critérios para estimação de toxicidade com estudos crônicos são sobrevivência e número total de neonatos gerados. Koivisto (1995) cita que o tamanho corpóreo é um fator importante que influencia o acúmulo de substâncias tóxicas nos animais.

No Modelo WTox, a reprodução é o parâmetro principal nos testes crônicos com *Daphnia magna*, assim, foram utilizadas metodologias de ensaios onde o principal objetivo é evidenciar uma eventual ação da substância testada sobre este processo. Os principais parâmetros monitorados durante 21 dias de teste são o número total de neonatos e número de progênes geradas por cada indivíduo.

Devido à importância dos testes crônicos, os mesmos foram selecionados como parâmetros de avaliação de risco ambiental para o Modelo WTox.

2.4.3 Organismos utilizados em testes de toxicidade aguda e crônica: *Daphnia magna* e *Vibrio fischeri*

2.4.3.1 *Daphnia magna*

A *Daphnia magna*, um microcrustáceo de água doce facilmente encontrado no hemisfério norte, é amplamente utilizada em testes de toxicidade aguda e crônica, testes regulatórios, bem como em pesquisa básica ecotoxicológica (Baudo, 1987; Koivisto, 1995; Hanazato, 1998; U.S.EPA, 2000). Estes organismos, que apresentam um ciclo de vida de cerca de trinta dias, são os mais indicados para bioensaios rápidos, pois são sensíveis a uma grande diversidade de poluentes, são facilmente cultiváveis em laboratório, são relativamente pequenos, possuem alta fecundidade, e reprodução partenogênica (Basso et al., 1990; Hanazato, 1998).

Na cadeia alimentar, estes organismos desempenham o papel de consumidores primários, pois alimentam-se por filtração de material orgânico particulado, principalmente de algas unicelulares (Knie e Lopes, 2004). Estes microcrustáceos se reproduzem por partenogênese cíclica, assim, durante a maior parte do ano, as populações consistem quase inteiramente de fêmeas. A produção de machos é estimulada

principalmente por causa de baixas temperaturas, ou alta densidade de indivíduos e subseqüente acumulação de produtos de excreção, e/ou uma diminuição de disponibilidade de alimento (U.S.EPA, 2002a). Na Figura 4 pode-se visualizar a *Daphnia magna*, organismo-teste amplamente utilizado em estudos de toxicidade aquática.



Figura 4 – Organismo-teste *Daphnia magna*

Fonte: Laboratório de Toxicologia Ambiental – LABTOX/ENS/UFSC.

2.4.3.2 *Vibrio fischeri*

Vibrio fischeri é uma bactéria Gram-negativa, marinha heterótrofa, pertencente à família *Vibrionaceae*, que contém espécies que desenvolvem interações tanto cooperativas quanto patogênicas em animais hospedeiros. A *Vibrio fischeri* tem uma distribuição global, principalmente em regiões temperadas e subtropicais, existindo sob as formas de vida: livre; como parte da comunidade de microorganismos do intestino de muitos mamíferos marinhos; ou em simbiose, como um “órgão luminoso” em muitas espécies de lulas e peixes (Nealson e Hastings, 1991).

A *Vibrio fischeri* é frequentemente utilizada em testes de toxicidade aguda. Em condições ambientais adequadas emite luz naturalmente, necessitando para isto oxigênio acima de 0,5 mg/L (Knie e Lopes, 2004). A Figura 5 apresenta bactérias emitindo luminescência.

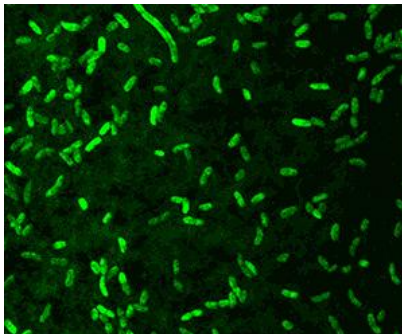


Figura 5 – Bactérias *Vibrio fischeri* emitindo luminescência
Fonte: Nelson e Sycuro (2009)

2.5 TOXICOLOGIA ESPECÍFICA: CITOTOXICIDADE, GENOTOXICIDADE E EPIGENÉTICA

A toxicologia específica aborda a ação deletéria de uma substância sobre o funcionamento de mecanismos biológicos específicos do organismo, como por exemplo, o efeito genotóxico. Em situações particulares, estes mecanismos podem ser chamados de biomarcadores de efeito.

Danos às estruturas celulares ou a observação de processos de morte celular são considerados efeitos citotóxicos (Ferreira e Matsubara, 1997). Estes efeitos podem ser gerados pelo estresse oxidativo causado por poluentes ambientais (Oakes e Van der Kraak, 2003).

A genotoxicidade estuda, sob o aspecto genético, o que altera a vida ou leva à morte tanto na célula como no organismo. É uma especialidade relativamente recente e se situa na divisa entre toxicologia e genética (Erdtmann, 2003).

Os agentes genotóxicos são aqueles que interagem com o DNA alterando sua estrutura ou função, e quando essas alterações se estabelecem ao ponto de serem transmitidas, denominam-se mutações. As mutações são as fontes de variabilidade genética de uma população, sendo, portanto essenciais para a manutenção das espécies. Porém, podem ocasionar doenças tanto aos indivíduos como a seus descendentes, dependendo da quantidade, do tipo, e do local onde ocorrem, e alterar o equilíbrio dos ecossistemas (Umbuzeiro e Roubicek, 2006).

Nos últimos anos, tem sido mais frequentemente observados relatos acerca da ocorrência de condições malignas e patofisiológicas em organismos aquáticos, após exposição à suspeitos genotóxicos. Neste contexto, os avanços no desenvolvimento de técnicas e diagnósticos, tem certamente aumentado a compreensão de como um organismo interage em âmbito molecular, celular ou individual em seu ambiente. Além disso, vários estudos têm avançado ao avaliar a indução de danos no material genético por genotoxinas em organismos aquáticos (Jha, 1998).

A informação de que somente 10% dos compostos químicos produzidos pelo homem foram avaliados adequadamente quanto a sua capacidade de causar mutação nos levam a refletir sobre a grande importância da existência de metodologias rápidas e eficientes para testá-los, sobretudo levando-se em conta a diversidade de misturas complexas que podem ser formadas quando esses compostos são lançados no meio ambiente. Atualmente, mais de 200 testes de genotoxicidade de curta duração estão descritos em bibliografias (Umbuzeiro e Roubicek, 2006).

Vários autores têm sugerido a utilização de uma série de testes para se avaliar o potencial mutagênico e/ou carcinogênico de uma substância específica (Hutchinson et al., 1998; Matias e Creppy, 1998a; Carvalho Pinto-Silva et al., 2003; Lah et al., 2008). Além disso, os ensaios de genotoxicidade e mutagenicidade são meios de se observar os efeitos de misturas complexas sem a necessidade de uma caracterização química precisa. A genotoxicidade de misturas desconhecidas é avaliada pela exposição das amostras à organismos vivos, que mais tarde são examinados a fim de se observar a ocorrência de danos genéticos (Lah et al., 2008).

Uma análise de risco toxicológica deve considerar a expressão da atividade genotóxica *in vivo*, e em organismos relevantes. Isto demonstrará as reais vias de exposição no meio ambiente, os efeitos do metabolismo e a eficiência de reparação do DNA (Jha et al., 2000). De acordo com Al-Sabti (1995), os peixes podem acumular poluentes por contaminação direta através de substâncias químicas presentes na água, ou por via indireta através da ingestão de organismos que acumulam poluentes. Desta forma, os peixes são importantes indicadores para monitorar danos citogenéticos não apenas em laboratório, onde os agentes genotóxicos podem ser previamente conhecidos, mas também para monitorar a presença destes agentes em águas superficiais ou em diferentes ecossistemas aquáticos.

Os mecanismos biológicos de alteração do DNA podem ser classificados por duas maneiras diferentes. Aquele onde o xenobiótico interage diretamente com o DNA, chamados genéticos, e aquele onde o xenobiótico reage com sistemas periféricos, induzindo alterações de sínteses biológicas capazes de alterar a bioquímica do DNA, chamados epigenéticos. Uma alteração epigenética é resultado de uma mudança na expressão gênica que não altera a seqüência do DNA, e que pode ser perpetuada através de gerações (Lewin, 2004).

Existem diversos ensaios para detectar danos em nível citotóxico, genético e epigenético. Os testes do micronúcleo e da fragmentação do DNA indicam a ocorrência de danos genéticos. A lipoperoxidação biológica indica a ocorrência de um efeito citotóxico que pode levar a alterações epigenéticas. A metilação do DNA indica possíveis alterações epigenéticas. Deste modo, a aplicação destas quatro metodologias em estudos de avaliação de risco ambiental representa uma alternativa de utilização, pois possibilita a verificação precoce de efeitos sobre a célula, o DNA e a expressão gênica, induzidos por poluentes ambientais. Por esta razão foram aplicadas no modelo de avaliação de risco ambiental WTox.

2.5.1 Teste do Micronúcleo

Atualmente uma das metodologias utilizadas para avaliar danos causados por substâncias genotóxicas nos organismos é o teste do micronúcleo. Esse tipo de teste tem sido recomendado para estudos de biomonitorização ambiental, principalmente por sua capacidade de avaliar alterações cromossômicas estruturais ou numéricas em algum momento do ciclo de vida das células (Carrano e Natarajan, 1988).

Micronúcleos são corpúsculos compostos por material cromossômico. Após a separação das cromátides no processo mitótico dois núcleos são reconstituídos, um em cada pólo. A membrana nuclear é recomposta ao redor destes dois conjuntos de cromossomos. Porém, se um cromossomo inteiro ou um fragmento cromossômico acêntrico não se integra ao novo núcleo (por não estar unido ao fuso), este também pode vir a constituir um núcleo individual, chamado micronúcleo (Villela et al., 2003).

Os micronúcleos são, estruturalmente, pequenos núcleos formados pelo material genético perdido pelo núcleo principal, em decorrência de um dano genético causado por agentes físicos, químicos

ou biológicos. Para a visualização do micronúcleo, é necessário que haja uma divisão celular após o evento mutagênico, por isto precisa-se realizar um cultivo celular (*in vitro*) ou então empregar células que estejam se multiplicando constantemente, como a medula óssea (*in vivo*) (Villela et al., 2003).

O teste do micronúcleo pode ser usado para analisar diferentes tipos de células de peixes, tais como eritrócitos, células de guelras, rins, fígado e barbatanas (Bolognesi et al. 2006). O método mais utilizado é o da contagem de eritrócitos micronucleados. De acordo com Pretti et al. (2007), esse teste consiste na coloração de um esfregaço de sangue e posterior contagem de eritrócitos para a quantificação de células contendo essas anormalidades como a ocorrência de núcleos lobulados, segmentados e em forma de rim, etc.

Para determinar a frequência de hemócitos micronucleados (Figura 6) são analisados, em teste cego, 2000 hemócitos normais por animal, e anota-se a frequência de hemócitos micronucleados visualizados (Silva, 2000). A análise citogenética é realizada em microscópio óptico.

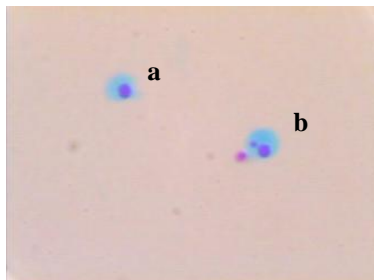


Figura 6 – a) Hemócitos normais e b) Hemócitos micronucleados
Fonte: Silva (2000).

As sucessivas inovações introduzidas no protocolo apontam a ampliação da aplicabilidade do teste do micronúcleo na solução de novos problemas, assim como a definição do seu uso como parte da bateria de testes recomendados pelas agências governamentais. Testes estes, mandatórios para o registro de novos produtos que entram anualmente no mercado mundial (Salvadori et al., 2003).

2.5.2 Avaliação da lipoperoxidação pela dosagem do MDA

O oxigênio é indispensável para a vida da maioria dos organismos na terra. A fonte da energia primária da célula é a produção de ATP mitocondrial, e esta ocorre à partir da redução de O_2 para H_2O . Ainda que mais de 90% do O_2 seja utilizado na oxidação mitocondrial, que adiciona quatro elétrons em cada molécula de O_2 para formar água ($O_2 + 4H^+ + 4e^- \rightarrow 2H_2O$), o oxigênio é utilizado como substrato por outras inúmeras enzimas. Muitas destas reações geram produtos como o íon superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Estes produtos são relativamente pouco reativos e fazem parte dos sistemas biológicos, mas são perigosos, pois desencadeiam os altamente reativos radicais hidroxil (OH) que estão envolvidos em numerosas formas de dano celular (Storey, 1996).

Um radical livre (como o hidroxil) é uma molécula ou um átomo que possui um elétron livre em sua camada externa. Os radicais livres têm geralmente uma curta duração de vida e sua recombinação é quase imediata. Eles têm uma forte tendência para estabilizar sua órbita externa, a captar um elétron de um outro átomo ou molécula que se torna uma forma radicalar. Portanto, eles são muito reativos e difíceis de serem estudados (Matias e Creppy, 1998b).

Os radicais livres produzem uma série de lesões no DNA, danificando bases, riboses, causando quebras simples de cadeia e criando ligações cruzadas entre DNA e proteínas (Saffi e Henriques, 2003). Os radicais livres têm uma importante função fisiológica e causam grandes danos nos ácidos nucleicos, proteínas, carboidratos e lipídios (em particular os ácidos graxos polinsaturados) (Bast e Goris, 1989 *apud* Matias e Creppy, 1998b).

Fosfolipídeos insaturados, glicolipídeos e colesterol em membranas celulares e outros sistemas são alvos proeminentes de ataques oxidantes. Isto pode resultar na lipoperoxidação, um processo degenerativo que perturba a estrutura ou a função do sistema atingido, geralmente com consequências citopatológicas (Girotti, 1998).

Segundo Matias e Creppy (1998b), a lipoperoxidação é descrita como uma reação em cadeia entre o oxigênio molecular ou radicalar e os ácidos graxos polinsaturados dos fosfolipídios membranares: é uma reação de auto-oxidação que deteriora os lipídios polinsaturados. Assim, o oxigênio molecular é capaz de produzir reações na célula, formando radicais livres altamente reativos, induzindo a lipoperoxidação das membranas, alterando sua integridade e aumentando sua permeabilidade (Figura 9).

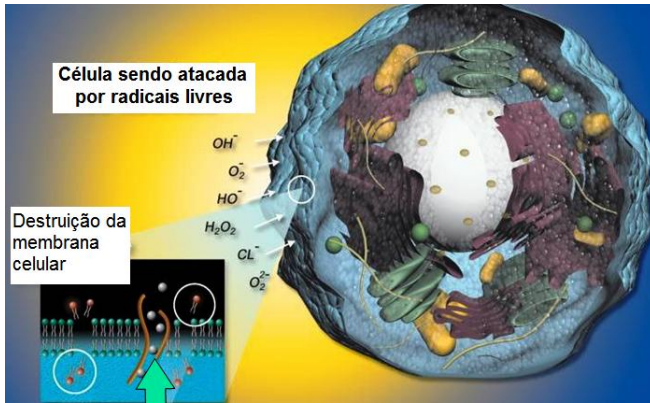


Figura 9 – Destruição da membrana celular sob o efeito de radicais livres oxigenados.

Fonte: Oxiscore, 2011.

Durante o processo de peroxidação lipídica existem 3 fases, iniciação, propagação e terminação, que são mostradas nas reações a seguir (Figura 10) (Matias e Creppy, 1998b):

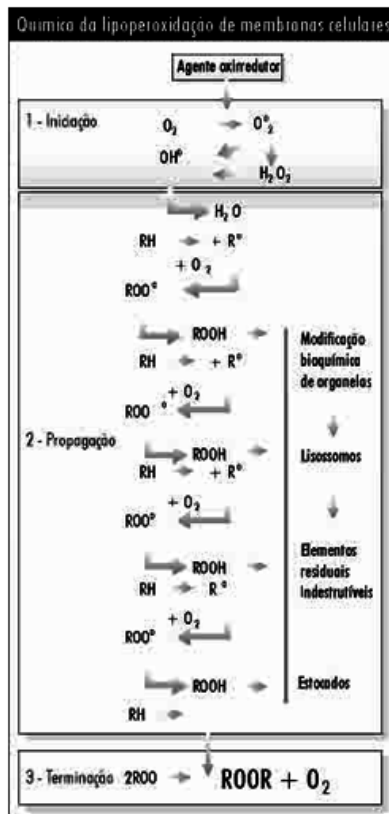


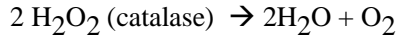
Figura 10 – Química da lipoperoxidação de membranas celulares.
Fonte: Matias e Creppy (1998b).

Com o objetivo de se proteger do ataque de radicais livres, a célula possui um sistema de defesa que pode atuar em duas frentes. Uma delas age como detoxificadora do agente antes que ele cause lesão. Esta frente é constituída por glutatona reduzida (GSH), superóxido-dismutase (SOD), catalase, glutatona-peroxidase (GSH-Px) e vitamina E. A outra linha de defesa é responsável por reparar a lesão ocorrida, e é constituída pelo ácido ascórbico, pela glutatona-reductase (GSH-Rd) e pela GSHPx, entre outros (Ferreira e Matsubara, 1997).

Ferreira e Matsubara (1997) citam alguns exemplos de enzimas antioxidantes, como a enzima superóxido-dismutase (SOD), que catalisa a dismutação do radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) em H_2O_2 e O_2 na presença do próton H^+ , conforme a reação a seguir:



Outra enzima antioxidante, a catalase - que é encontrada no sangue, medula óssea, mucosas, rins e fígado - transforma H_2O_2 em água e oxigênio:



O desequilíbrio entre o ataque e a defesa é induzido pela toxicidade de certos metais, solventes, pesticidas e drogas, provocando diversas condições patológicas em humanos, entre elas arteriosclerose, envelhecimento, doenças reumáticas e desordens do fígado (Comparoti, 1985 e Suematsu e Abe, 1982 *apud* Matias e Creppy, 1998b).

O malondialdeído (MDA), um dos produtos gerados na lipoperoxidação, está fortemente relacionado com danos às proteínas (Suji e Sivakami, 2008; Traverso et al., 2004). Assim, a sua dosagem *in vivo* e/ou *in vitro* evidencia o desequilíbrio entre o sistema de defesa e ataque nas células.

A lipoperoxidação pode ser considerada como um biomarcador precoce de efeitos, pois é induzida em organismos aquáticos através da exposição a agentes tóxicos como efluentes industriais, toxinas marinhas, metais e pesticidas (Ahmad et al., 2000; Almeida et al., 2007; Avci et al., 2005; Matias, 1996; Oakes e Van der Kraak, 2003; Üner et al., 2006).

2.5.3 Avaliação da metilação biológica do DNA pela dosagem da m^5dC

A metilação do DNA está ligada à transcrição do DNA bem como à ativação e inativação de genes. Ela é controlada por enzimas chamadas metiltransferases, que adicionam ou removem grupos metil à posição 5 da citosina (Figura 11). Em células animais de 2 a 7% das citosinas são metiladas (Lewin, 2004; Robertson, 2001).

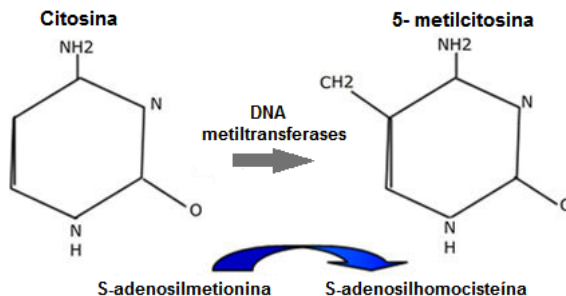


Figura 11 – Reação de metilação do DNA catalisada pelas DNA-metiltransferases.

Fonte: Rodriguez (2010).

De acordo com Esteller (2003) a metilação do DNA é a mais importante modificação epigenética em mamíferos e tem sido denominada como um mecanismo de controle para a transcrição seletiva ou inativação de genes específicos. Estas alterações são determinantes para o desenvolvimento e a manutenção de funções celulares (Pogribny e Beland, 2009). Entretanto, estudos sugerem que a metilação anormal está relacionada principalmente com a carcinogênese (Aniagu et al., 2008; Matias e Creppy, 1998b).

Muitos trabalhos mostram que a fixação covalente de cancerígenos sobre o DNA geralmente causa modificações na sua capacidade de ser metilado. A presença de um xenobiótico cancerígeno no DNA provocará uma mutação ou um aumento da metilação (hipermetilação). A metilação anormal é um fenômeno difundido quando se trata de câncer e pode ser observada nas primeiras mudanças durante a oncogênese (Pfohl-Leskowicz et al., 1984; Pfohl-Leskowicz e Dirheimer, 1986; Matias e Creppy, 1998a; Esteller, 2003). A hipermetilação está relacionada com a inativação de genes supressores de tumor (Esteller, 2003), enquanto que a hipometilação está relacionada com a expressão de oncogenes (Pfohl-Leskowicz et al., 1984).

Certos cancerígenos inibem a DNA-metilase ou interferem na metilação normal. A consequência direta deste processo consiste na ativação de oncogenes celulares, retirando da célula a proteção de seu sistema de regulação. O modelo anormal provocado pela exposição ao cancerígeno será conservado de geração a geração devido à inativação da DNA-metilase de manutenção. Assim, toda ação sobre a metilação dos genes é perigosa e poderá constituir um sinal específico para

ativação ou a desativação de genes, podendo causar o desenvolvimento de um câncer (Matias e Creppy, 1998a).

Em organismos aquáticos como microcrustáceos, peixes e anfíbios, os poluentes ambientais podem provocar a alteração da metilação do DNA (Huang et al., 2007; Vandegheuchte et al., 2009a, 2009b; Wright et al., 2010).

2.5.4 Organismo utilizado para testes de toxicologia específica: *Oreochromis niloticus*

A *Oreochromis niloticus*, ou tilápia, como é popularmente conhecida, é um peixe da família *Cichlidae*, subfamília *Pseudocrenilabrinae* (Figura 12). É originária da África, mas foi introduzida em diversos países para fins de aquicultura. O indivíduo adulto atinge tamanhos de até 60 cm (machos), e vive em águas de temperaturas entre 14 e 33°C (Fishbase, 2010). As tilápias sobrevivem em faixa de pH entre 5 e 10, entretanto um pH entre 6 e 9 é o ideal para estes organismos (Popma e Masser, 1999).

A tilápia pode ser encontrada em diversos habitats de água doce, como rios, lagos, e em canais irrigados. Apresenta espinhos nas nadadeiras dorsal e anal. Tem reprodução ovípara, e a fêmea guarda e incuba os ovos em sua cavidade bucal até o nascimento dos alevinos. Alimentam-se principalmente de fitoplâncton e de algas bentônicas (Fishbase, 2010).



Figura 12 – Organismo-teste *Oreochromis niloticus*
Fonte: Fishbase (2010).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Apresenta-se neste tópico a metodologia utilizada para a realização dos ensaios de toxicidade, e as características do software WTox. Os testes toxicológicos foram realizados com amostras de fração solúvel de resíduos industriais, e executados no Laboratório de Toxicologia Ambiental – LABTOX, no Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da UFSC.

3.1 RESÍDUOS INDUSTRIAIS - PROCEDIMENTOS

Os procedimentos em relação à utilização dos resíduos industriais neste trabalho estão descritos a seguir.

3.1.1 Amostragem

Neste trabalho, a amostragem de campo foi realizada conforme os procedimentos da NBR 10007 (ABNT, 2004c), e a amostragem de laboratório baseou-se no Fluxograma de Lixiviação - Anexo B - da NBR 10005 (ABNT, 2004b).

As dez amostras utilizadas foram coletadas no Aterro Industrial e Sanitário de Blumenau (SC) – AISB, logo que os resíduos entraram no estabelecimento. Foram coletadas amostras de resíduos das indústrias têxtil, metal-mecânica e de papel e celulose. Cada amostra estava previamente classificada de acordo com a metodologia da NBR 10004 (ABNT, 2004a). Para esta classificação, a análise físico-química foi realizada conforme a metodologia da APHA et al. (2005). Amostras do mesmo tipo de resíduo foram selecionadas de acordo com suas características físico-químicas, e apenas aquelas que apresentavam grande semelhança em sua composição foram coletadas. Os dados físico-químicos de cada tipo de resíduo industrial são uma média das concentrações de cada amostra (Tabela 1).

As amostras se apresentavam nos estados sólido, ou pastoso, e foram acondicionadas em frascos de polietileno, devidamente tampados e identificados. Em seguida, as amostras foram preservadas em caixas térmicas de isopor com gelo comum e transportadas para o Laboratório de Toxicologia Ambiental.

As amostras que seriam utilizadas em até dois dias após a coleta permaneceram refrigeradas e ao abrigo da luz. As amostras que não seriam utilizadas no período de 48h após a coleta foram congeladas à

temperatura de -20°C (Brentano, 2006), para posterior realização dos ensaios toxicológicos.

Os resíduos foram caracterizados, conforme a NBR 10004 (ANBT, 2004a), como lodos de estação de tratamento de efluentes de Classe IIA, provenientes das seguintes indústrias: têxtil, metal-mecânica, e papel e celulose (Tabela 1).

Tabela 1 – Características das amostras de resíduos industriais coletados no Aterro Industrial e Sanitário de Blumenau, conforme classificação da NBR 10004 (ABNT, 2004a).

Parâmetros analisados	Descrição do Resíduo Industrial						Limites da Norma NBR 10004 (ABNT, 2004)
	Lodo de ETE proveniente da indústria têxtil.		Lodo de ETE proveniente da indústria metal-mecânica.		Lodo de ETE proveniente da indústria de papel e celulose.		
	Amostras n° TX1, TX2, TX3 e TX4		Amostras n° MM1, MM2 e MM3		Amostras n° PP1, PP2 e PP3		
	Peso seco (mg/kg)	Fração solúvel (mg/L)	Peso seco (mg/kg)	Fração solúvel (mg/L)	Peso seco (mg/kg)	Fração solúvel (mg/L)	
Alumínio	-	-	ND	-	-	-	*
Arsênio	38,77	ND	ND	ND	49,53	0,004	1,0
Bário	-	12,72	ND	ND	-	0,72	70
Cádmio	4,73	0,05	ND	ND	-	0,04	0,5
Chumbo	155,77	0,72	4,6	0,24	709,87	0,59	1,0
Cianetos	47,07	-	ND	-	-	-	*
Cloretos	-	-	939,5	-	-	-	*
Cobre	-	-	ND	ND	-	-	*
Cromo _{total}	50,59	1,46	228,58	0,25	98,98	0,07	5,0
Fenol	4,61	-	8,73	-	1,2	-	*
Ferro	-	0,05	39631,8	-	-	-	*
Magnésio	-	-	240,34	-	-	-	*
Manganês	-	-	148,3	-	-	-	*
Mercurio	ND	ND	ND	ND	0,09	0,0001	0,1
Níquel	-	-	0,63	0,13	-	-	*
Óleos e graxas	-	-	0,08	-	-	-	*
Prata	-	-	ND	ND	-	0,03	5,0
Selênio	9,2	0,15	ND	ND	4,67	0,05	1,0
Zinco	-	0,1	639,22	1,45	-	-	*

Notas: (ª) Descrição conforme Laudo de Classificação apresentado ao Aterro Industrial e Sanitário de Blumenau pelas empresas responsáveis pelo resíduo industrial. (-) Não analisado. (ND) Não detectado. (*) Limite não definido pela NBR 10004.

3.1.2 Obtenção da fração solúvel das amostras

Para obtenção de um extrato solúvel das amostras de resíduos industriais coletados, utilizou-se o conceito apresentado na NBR 10005 (ABNT, 1987). Esta Norma afirma que a lixiviação é o processo para determinação da capacidade de transferência de substâncias orgânicas e inorgânicas presentes no resíduo sólido, por meio de dissolução no meio extrator. Assim, utilizou-se a Norma Técnica NBR 10005 – Procedimento para obtenção de extrato lixiviado de resíduos sólidos (ABNT, 2004c), que tem por objetivo fixar os requisitos exigíveis para obtenção de extrato lixiviado de resíduos sólidos, visando diferenciar os resíduos classificados pela NBR 10004 como Classe I – perigosos – e Classe II – não perigosos. Esta metodologia foi escolhida por ser um procedimento mais rápido (duração total de 18h) se comparado com o da NBR 10006 – Procedimento para obtenção de extrato solubilizado de resíduos sólidos (ABNT, 2004c), que tem uma duração de sete dias para a preparação do extrato solubilizado.

A NBR 10005 (ABNT, 2004b) possui diversos procedimentos, que mudam conforme o teor de sólidos da amostra, e se ela é volátil ou não. Para a análise das amostras coletadas considerou-se que todos os resíduos continham um teor de sólidos igual a 100%, e que não eram voláteis. Deste modo, utilizou-se o primeiro procedimento da Norma – “5.2 Lixiviação para resíduos contendo teor de sólidos igual a 100%”, e em seguida - “5.2.1 Lixiviação de não voláteis”. O fluxograma de lixiviação realizado foi baseado no Anexo B na Norma NBR 10005, com algumas simplificações, conforme os passos a seguir (Figura 13):

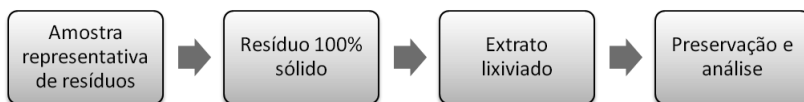


Figura 13 – Fluxograma de Lixiviação de Resíduos, baseado no Anexo B da NBR 10005 (ABNT, 2004b).

Neste trabalho, o processo de lixiviação se deu de uma forma mais simples do que a proposta pela NBR 10005, para que não houvesse alterações no composto original das amostras coletadas na entrada do Aterro Industrial e Sanitário de Blumenau. Assim, não foram utilizadas soluções de extração (que contêm ácidos), e nem filtros ou peneiras para reduzir o tamanho dos grãos contidos nas amostras.

O procedimento de preparação da amostra se deu da seguinte maneira: 100g de amostra bruta foram pesados com uma balança analítica de precisão, e adicionados a 2,0L de água destilada no frasco de lixiviação. O frasco foi devidamente tampado e utilizou-se fita de PTFE para evitar vazamentos. O frasco foi mantido sob agitação durante 18h, com uma rotação de 30 rpm, no agitador rotatório (Figura 14).



Figura 14 – Procedimento de preparação de amostras.

Neste trabalho, a correção do pH durante o processo não foi realizada (como é sugerido pela NBR 10005), pois a adição de ácidos ou bases modificaria a amostra original, e assim não refletiria com eficiência os efeitos que poderiam ser observados nos organismos em ambiente natural.

Após a agitação, aguardou-se duas horas para favorecer a decantação, e o sobrenadante das amostras (fração solúvel) foi reservado. O pH e Oxigênio Dissolvido destas frações solúveis foram medidos, para que em seguida fossem utilizadas nos ensaios de toxicidade aguda, sem que houvesse filtração. Os dados obtidos serviram apenas para controle da qualidade da fração solúvel, indicando se o teste de toxicidade aguda poderia ser feito sob estas condições, e se ele poderia ser considerado eficiente. A metodologia seguida para a realização destes testes encontra-se descrita em *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater* (APHA et al., 2005).

3.1.3 Preservação da fração solúvel

Para a realização dos testes de toxicidade aguda, as amostras da fração solúvel foram preservadas sob refrigeração a 4°C e ao abrigo da luz, nos frascos de lixiviação, por um período de até sete dias, caso fosse necessária a sua utilização em mais de um ensaio.

Para a realização dos testes de toxicidade crônica, a preservação das amostras se deu da seguinte maneira: as amostras foram congeladas em alíquotas logo após o término do processo de solubilização e mantidas à -20°C, sendo desta forma, preservadas por no máximo 60 dias. O descongelamento das alíquotas foi realizado à temperatura ambiente, em água corrente ou outro mecanismo cuja temperatura não ultrapassasse 25°C. Após o completo descongelamento, a amostra foi utilizada em até 12h, não voltando novamente ao congelamento para ensaios. Quando foi possível realizar o teste crônico nas 48h seguintes à lixiviação, a alíquota que seria utilizada era preservada resfriada em temperatura a 4°C e ao abrigo da luz.

Para os testes de citotoxicidade e genotoxicidade as frações solúveis passaram pelo mesmo procedimento de preservação do teste agudo.

3.2 ENSAIOS DE TOXICIDADE

A toxicidade aguda foi avaliada em bactérias *Vibrio fischeri* e microcrustáceos *Daphnia magna*. A toxicidade crônica foi avaliada em *Daphnia magna*. A citotoxicidade e a genotoxicidade foram avaliadas em peixes *Oreochromis niloticus*. A metodologia para realização de cada teste está descrita nos itens a seguir.

3.2.1 Metodologia de cultivo de microcrustáceos *Daphnia magna*

Para a realização dos ensaios de toxicidade aguda foram utilizados os organismos-teste *Daphnia magna* Straus, 1820, que são cultivados no Laboratório de Toxicologia Ambiental (LABTOX) – ENS/ UFSC. O cultivo do organismo-teste foi realizado segundo as normas ISO 6341 (ISO, 1996) e DIN 38412 (DIN, 1989). Foram utilizados recipientes com capacidade para 1,5L de meio de cultura M4, meio utilizado para crescimento dos organismos. Os organismos foram

alimentados com cultura algácea de *Scenedesmus subspicatus* produzido conforme ISO 8692 (ISO, 1986), no meio de cultura CHU (CHU, 1942).

Cada lote comportou de 25 a 30 indivíduos, exclusivamente fêmeas, pois elas são geneticamente idênticas. As culturas foram mantidas em ambiente com temperatura controlada a $20 \pm 2^\circ\text{C}$ e em fotoperíodo de 16h de luz e $\text{OD} \geq 2,0 \text{ mg/L}$. Os lotes receberam manutenção três vezes por semana, quando foi observada a possível ocorrência de efípios, a realização da troca do meio de cultura, eliminação das carapaças e retirada dos neonatos.

Para cada teste, a sensibilidade dos organismos foi avaliada através de um ensaio padronizado de acordo com a ISO 6341 (1996), com a substância de referência dicromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$). De acordo esta norma, a $\text{CE}_{50,24\text{h}}$ para testes de sensibilidade com *Daphnia magna* deve estar entre 0,6 e 1,7 mg/L.

3.2.2 Teste de toxicidade aguda com *Daphnia magna*

Os testes de toxicidade aguda com a fração solúvel dos resíduos sólidos industriais foram realizados conforme a metodologia descrita pela NBR 12713 (ABNT, 2003). As amostras foram diluídas com o meio ISO, conforme ISO 6341 (ISO, 1996) em quatro concentrações, sendo elas 100, 50, 25 e 12,5% (Figura 15), e o tempo de exposição dos organismos às diluições foi de 48 h. Para cada amostra foi realizado um teste. Houve casos em que não foi possível calcular a $\text{CE}_{50,48\text{h}}$ devido à imobilidade de todos os organismos, assim, o teste foi repetido com concentrações mais baixas da amostra, até que se encontrasse o valor da $\text{CE}_{50,48\text{h}}$. Para cada concentração preparou-se 50 mL de amostra diluída, que foram separados em dois recipientes, cada um com 25 mL da diluição. Em cada recipiente foram inseridos 10 organismos jovens (entre 2 e 26 horas de vida), resultando em uma observação da imobilidade de 20 indivíduos. O período de exposição foi de 48h, sem alimentação e luminosidade, e temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ e $\text{OD} \geq 2,0 \text{ mg/L}$.

Para que houvesse um controle dos ensaios, um recipiente com meio teste (meio ISO) com 25 mL foi mantido com 10 organismos jovens. Este controle também foi realizado em duplicata. O meio ISO é composto por: cloreto de cálcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), a uma concentração de 73,52 g/L; sulfato de magnésio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), a uma concentração de 123,3 g/L; cloreto de potássio (KCl), a uma concentração de 5,8 g/L; e bicarbonato de sódio

(NaHCO_3), efetuando filtração estéril da solução, a uma concentração de 64,8 g/L. O ensaio foi considerado válido quando a porcentagem de organismos imóveis no controle não excedeu 10%.

Em todos os ensaios foram observados o número de organismos imóveis em cada concentração e com estes dados foi possível calcular a concentração letal $\text{CE}_{50,48\text{h}}$ (expresso em porcentagem). Seguindo as recomendações da EPA 821-R-02-012 (U.S.EPA, 2002a), a $\text{CE}_{50,48\text{h}}$ foi calculada utilizando o método Trimmed Spearman-Kärber.

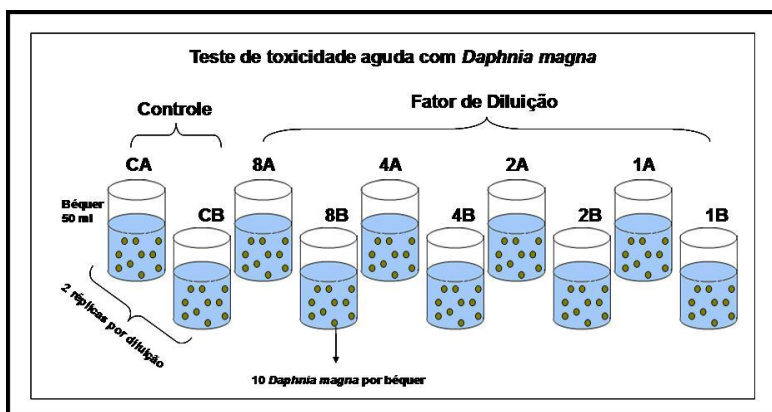


Figura 15 – Esquema do teste de toxicidade aguda com *Daphnia magna*.
Fonte: Fuzinato (2009).

3.2.3 Teste de toxicidade crônica com *Daphnia magna*

Os testes de toxicidade crônica de 21 dias foram realizados conforme ISO 10706 (ISO, 2000), Bianchini e Wood (2002), e Brentano (2006), com modificações. Foram realizadas quatro diluições da amostra, e um controle negativo foi mantido para cada teste (somente água reconstituída - meio M4). As diluições (soluções-teste) foram preparadas de acordo com os resultados observados nos testes de toxicidade aguda, e em um teste rápido de toxicidade sub-crônica de 6 dias. Em todas as amostras, as diluições seguiram progressão geométrica na razão de 2, exceto nas amostras MM1 e MM3, onde foram preparadas as diluições de 1,56, 1,04, 0,78 e 0,56%. Estas diluições foram preparadas no momento do teste, utilizando proporções adequadas de amostra e água reconstituída (meio M4). Para cada diluição foram utilizados 10 organismos jovens de *Daphnia magna* em

béqueres individuais de 50mL. Após a introdução de uma alíquota de 25mL da solução-teste em cada béquer, cobriu-se cada um dos recipientes com plástico-filme para evitar a evaporação da solução e/ou contaminação com partículas suspensas no ar. Um esquema do teste pode ser observado na Figura 16.

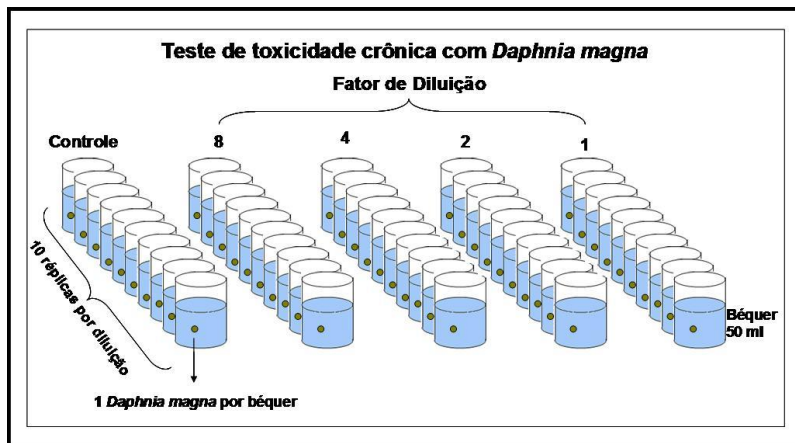


Figura 16 – Esquema do teste de toxicidade crônica com *Daphnia magna*.

Fonte: Fuzinatto (2009).

Os testes foram mantidos com luminosidade difusa (fotoperíodo de 16h de luz) e temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ e $\text{OD} \geq 2,0 \text{ mg/L}$. Os organismos foram alimentados diariamente com a alga clorofícea *Scenedesmus subspicatus*. Durante a primeira semana de testes os organismos foram observados diariamente. Após este período, as observações ocorreram três vezes por semana, em dias intercalados. Os parâmetros observados foram o número de organismos sobreviventes, número de neonatos e posturas geradas por fêmeas. Nestes dias, realizava-se a troca da solução-teste antiga (com 48h) pela nova solução teste. A nova solução teste sempre se encontrava na temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ no momento da transferência dos organismos. As daphnias adultas eram provisoriamente inseridas em um béquer com meio de cultura M4. Contabilizavam-se os neonatos vivos ou com mobilidade. Em seguida se descartava a solução teste antiga, higienizava-se o béquer com água destilada, e introduzia-se a nova solução teste ao béquer.

O Protocolo que se encontra no Apêndice 4 foi utilizado para registrar as observações realizadas ao longo do teste. Para avaliação do parâmetro fecundidade foi realizada a contagem dos neonatos gerados

por cada fêmea adulta. A média de neonatos foi obtida dividindo-se o número total de neonatos gerados pelo número total de posturas no período de 21 dias (Equação 1).

$$\text{Média} = \frac{\text{número total de neonatos}}{\text{número total de posturas}} \quad (\text{Equação 1})$$

Para se obter a média de neonatos por diluição foi realizada a soma das médias de neonatos e dividiu-se pelo número de réplicas que geraram neonatos (Equação 2).

$$\text{Média por diluição} = \frac{\text{somatório das médias por réplica}}{\text{número de réplicas}} \quad (\text{Equação 2})$$

Conforme recomendação da EPA 821-R-02-013 (U.S.EPA, 2002b), a análise estatística para comparação entre as médias de fecundidade geradas em cada diluição com as médias obtidas no controle de cada teste foi realizada com testes de Dunnett ou teste-t com ajuste de Bonferroni, com auxílio do Programa Dunnett Versão 1.5 (U.S.EPA, 1999), sendo $\alpha < 0,05$.

3.2.4 Ensaio de toxicidade aguda com *Vibrio fischeri*

Os ensaios de toxicidade aguda com as bactérias marinhas luminescentes *Vibrio fischeri* foram realizados conforme a norma ISO 11348-3 (ISO, 2007), e conforme a metodologia desenvolvida para o equipamento Microtox® 500 (Azur Environmental, 1997). Os procedimentos executados para a realização do teste foram controlados pelo software Microtox Omni 4.0 que é gerenciado pelo próprio equipamento. Os passos realizados para a execução do teste estão demonstrados no Apêndice 3.

O Microtox é um aparelho que consiste em um luminômetro com unidade integrada de comando e medição, e um termobloco embutido no luminômetro (Figura 17a). O termobloco possui seis seqüências, designadas A, B, C, D, E e F. Cada seqüência possui cinco compartimentos numerados para a disposição das cubetas utilizadas na preparação e execução do teste (Figura 17b). Ao lado das seqüências há um compartimento para o frasco com a solução de reconstituição. Esta

solução possibilita que as bactérias *Vibrio fischeri* (linhagem NRRL B-11177), adquiridas na forma liofilizada, tenham seu metabolismo e emissão de luz reativados.

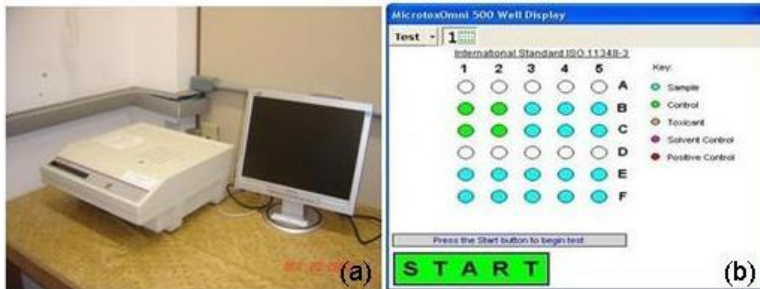


Figura 17 – Microtox: equipamento (a), e esquema do termobloco (b).

O teste foi realizado no termobloco com temperatura constante de $15 \pm 1^\circ\text{C}$, e o reagente bacteriano foi mantido à temperatura de 3°C . Seguindo a recomendação da ISO 11348-3 (ISO, 2007), e as instruções do equipamento, mediram-se a salinidade, o pH e o oxigênio dissolvido de todas as amostras. Como nenhuma amostra apresentou salinidade, todas foram corrigidas adicionando-se 0,20g de Cloreto de Sódio (NaCl) à 10 ml de cada amostra, assim, todas as soluções apresentaram 20% de NaCl. As amostras que apresentaram $\text{pH} < 6$ ou $\text{pH} > 8,5$ tiveram o pH ajustado para 7. Quanto ao oxigênio dissolvido, todas as amostras apresentaram valores de acordo com o recomendado para realização dos testes, ou seja, $\text{OD} > 0,5 \text{ mg/L}$.

Em testes de toxicidade com *Vibrio fischeri* não é possível testar a amostra bruta (100%), pois com a adição de soluções, automaticamente ocorre a diluição. A diluição mais próxima a 100% de amostra corresponde ao fator de diluição 1:1,25, ou seja, 80% de amostra. Este fator de diluição é considerado 1:1, pois é o mais próximo que se pode testar da amostra bruta. Neste estudo foram realizadas 8 diluições, iniciando com 6,25% de amostra, que corresponde ao fator de diluição 16 até 80% de amostra, que corresponde ao fator de diluição 1:1,25. O Quadro 6 demonstra a série de diluições utilizadas.

FD	Diluição da amostra	Diluição da amostra no teste	% Concentração de amostra no teste	Cubeta
1	0	1:1,25	80,00	E5, F5
2	0	1:2	50,00	E4, F4
3	1:1,5	1:3	33,33	E3, F3
4	1:2	1:4	25,00	E2, F2
6	1:3	1:6	16,67	E1, F1
8	1:4	1:8	12,50	B5, C5
12	1:6	1:12	8,33	B4, C4
16	1:8	1:16	6,25	B3, C3
Controle				B2, C2
Controle 80%				B1, C1

Quadro 6 – Série de diluições utilizadas nos testes agudos com *Vibrio fischeri*.

Os resultados foram determinados através da $CE_{50,30\text{min}}$ (%) que corresponde à concentração efetiva que causa a inibição de 50% da luminescência, no tempo de 30 min. Os cálculos da $CE_{50,30\text{min}}$ (%) foram realizados pelo software do equipamento.

3.2.5 Acclimação de peixes *Oreochromis niloticus*

Os organismos utilizados neste estudo foram coletados em um criadouro de peixes (Piscicultura Panamá, Paulo Lopes, SC). Os peixes (peso = $30,6 \pm 0,3$ g; comprimento = 11 ± 2 cm) foram acclimatados por um período de 15 dias, em tanques de 130 L com água aerada e sem cloro, com luminosidade difusa (fotoperíodo de 16h de luz) e temperatura de $20^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$. Os restos de alimentos não consumidos e o material fecal foram retirados dos tanques de estoque e a água foi renovada a cada 48h. Os organismos foram alimentados a cada 48h com ração para alevinos (Peixe Juvenil, Acqua Line, Supra, RS, Brasil) contendo 42% de proteína e 500 mg/kg de vitamina C. A utilização dos animais foi aprovada pelo Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA - UFSC, PP00613).

3.2.6 Exposição dos peixes às amostras da fração solúvel de resíduos industriais

Os peixes foram mantidos em aquários individuais de 2L sob aeração, e foram expostos às frações solúveis de resíduos industriais em períodos de 48h, de acordo com as concentrações demonstradas na Tabela 2. Estas concentrações foram empregadas com o objetivo de limitar e minimizar a utilização de organismos em testes preliminares para definir a concentração letal de cada amostra. Assim, adaptaram-se concentrações encontradas em diversas referências bibliográficas (Çavas e Ergene-Gözücara, 2003; Wahbi et al., 2004; Mishra e Mohanty, 2008), de acordo com as características da substância, a espécie, o peso e o tamanho dos organismos-teste. O controle negativo e o positivo também foram realizados com apenas um organismo, em razão de limitar e minimizar a quantidade de organismos utilizados em experimentação. Para o controle negativo, um organismo foi exposto à água do tanque de aclimação e para o controle positivo, um organismo foi exposto à concentração de 2,5 mg/L de dicromato de potássio (concentração subletal de $K_2Cr_2O_7$, adaptada ao peso do organismo, baseado em Mishra e Mohanty, 2008).

Para as amostras de fração solúvel de resíduos têxteis, as concentrações de 6,25, 12,5 e 25% foram adaptadas de Çavas e Ergene-Gözücara (2003), que observaram efeitos genotóxicos em *O. niloticus* (peso: $30 \pm 5,5g$ and tamanho: $9,5 \pm 1,5$ cm) expostos à efluentes têxteis. Neste estudo, as concentrações de 5, 10 e 20% induziram a formação de micronúcleos e anormalidades no núcleo em eritrócitos dos organismos. Como a fração solúvel de resíduo não pode ser igualmente comparada com o efluente bruto, optou-se por aumentar as concentrações de exposição da amostra solubilizada, já que a concentração de substâncias tóxicas provavelmente é menor.

Resíduos da indústria metal-mecânica possuem grandes quantidades de cromo em sua composição (Chandra et al., 2005; Jha et al., 2001). Assim, utilizou-se uma adaptação das concentrações utilizadas por Mishra e Mohanti (2008), que observaram que em peixes *Chana punctatus* (peso: 50-55g; tamanho: 18-20cm) expostos às concentrações de 20mg/L e 40mg/L apresentaram comportamento anormal, alterações no nado e perda de equilíbrio. Desta forma optou-se por utilizar a diluição de 25% das amostras MM1 e MM2 brutas para observar os efeitos da fração solúvel de resíduos da indústria metal-mecânica em *Oreochromis niloticus*. A amostra MM3 estava

caracterizada como resíduo de galvanoplastia, portanto buscou-se uma referência de diluição para este tipo específico de amostra. Chen et al. (2001) observaram uma $CL_{50,96h}$ de 11,5% em *Oreochromis mossambicus* jovens (2-3 meses de idade) expostas a um efluente de galvanoplastia. Assim, no presente trabalho, como forma de garantir a sobrevivência do organismo durante as 48h de exposição, optou-se por utilizar a concentração de 6,25% para diluição da amostra MM3.

Para as amostras de fração solúvel de resíduos da indústria de papel e celulose, utilizou-se a concentração de 25% pois, de acordo com Wahbi et al. (2004), peixes da espécie *Lithognathus mormyrus* (peso médio: 99g; tamanho médio:15cm) apresentaram quedas significativas na quantidade de proteínas em músculo e gônadas quando os mesmos foram expostos à concentração de 20 mL/L de efluentes da indústria de papel e celulose.

Tabela 2 – Concentrações de exposição à fração solúvel de resíduos industriais, adaptadas de acordo com respectiva referência bibliográfica.

Tipo de indústria	Amostra nº	Concentração	Referência Bibliográfica
Têxtil	TX3	6,25%	adaptado de Çavas e Ergene-Gözücara (2003)
	TX1 e TX4	12,5%	
	TX2	25%	
Metal-mecânica	MM3	6,25%	adaptado de Chen et al. (2001)
	MM1 e MM2	25%	
			adaptado de Mishra e Mohanty (2008)
Papel e Celulose	PP1, PP2 e PP3	25%	adaptado de Wahbi et al. (2004)

Durante o período de exposição, os peixes permaneceram com luminosidade difusa (fotoperíodo de 16h de luz), temperatura ambiente de $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, e sem alimentação. Os eritrócitos dos peixes foram coletados por punção da veia caudal, e preservados em 0,5 mL de anticoagulante EDTA. Os eritrócitos coletados foram utilizados nos ensaios do Micronúcleo, da Metilação do DNA e da Lipoperoxidação Biológica.

3.2.7 Teste do micronúcleo

Este teste foi realizado conforme Carvalho Pinto-Silva et al. (2003). Após a retirada dos eritrócitos dos peixes, duas lâminas foram preparadas para cada animal. As lâminas com os esfregaços de eritrócitos foram lavadas levemente com água destilada e permaneceram secando a temperatura ambiente. As células foram fixadas em uma solução de metanol, por 10 minutos. Em seguida, as lâminas foram coradas pelo método Feulgen-Fast-Green.

A análise citogenética foi realizada em microscópio óptico (Olympus BX40) com resolução de 10 x 100. O critério adotado para identificar os micronúcleos foi o de Tates et al. (1980) que define os micronúcleos como inclusões citoplasmáticas esféricas, apresentando contorno definido, com diâmetro de 1/10 a 1/3 em relação ao núcleo, com coloração e estrutura similar ao mesmo. Somente células íntegras foram consideradas para a análise, ou seja, com membrana celular e nuclear intactas. Seguindo este critério, os micronúcleos foram contabilizados em um total de 2000 células analisadas por amostra, em teste cego.

3.2.8 Metilação do DNA: extração e quantificação da 5-metilcitosina

Os procedimentos que envolvem a metilação do DNA foram realizados baseando-se em Matias e Creppy (1998a), no protocolo de extração de DNA genômico pelo método fenol-clorofórmio adaptado de Bardakci e Sibinski (1994) e em Melegari (2010), com algumas modificações. Estas metodologias foram realizadas em três etapas (Figura 18), conforme descrito a seguir:

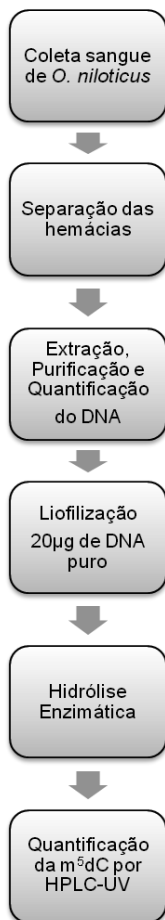


Figura 18 – Esquema geral dos procedimentos para o teste de Metilação do DNA.

Etapa 1 – Extração, purificação e quantificação do DNA: Após a exposição dos peixes às amostras de lixiviados industriais por 48h, os eritrócitos coletados foram acondicionados em tubos Eppendorf livres de DNA e RNA com capacidade para 2 mL, e separados em alíquotas de 200µL. Este procedimento foi realizado em duplicata, sendo utilizados os eritrócitos de um peixe por amostragem sanguínea. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 2000g por 10 min. para a separação das

hemácias e do plasma. O plasma sobrenadante foi retirado e armazenado para a utilização no ensaio de lipoperoxidação. As células decantadas foram ressuspensas com 400µL do tampão de lise celular (1M Tris HCl pH 7,4; 1M NaCl; 0,5M EDTA pH 8; 10% SDS; Água miliQ). Logo após, adicionou-se 10µL de Proteinase K e os tubos foram fortemente agitados por 5 seg. Em seguida procedeu-se à digestão enzimática das proteínas em banho-maria a uma temperatura de 45°C por 2h, agitando-se os tubos a cada 20 min. para homogeneizar bem a solução. Após a digestão, as amostras foram colocadas em um recipiente com gelo para evitar a degradação do DNA.

Após a digestão das proteínas, verificou-se a quantidade de material contido no Eppendorf e adicionou-se igual volume de fenol (500 µL). Os tubos foram invertidos suavemente por 10 min., para homogeneização da mistura. Em seguida os tubos foram centrifugados a 14000g por 10 min. a 4°C. Após a centrifugação retirou-se a fase aquosa, que foi colocada em um novo Eppendorf livre de DNA e RNA. Este procedimento foi realizado por mais duas vezes, porém na segunda vez adicionou-se igual volume de fenol:clorofórmio e na terceira vez, igual volume de clorofórmio. Ao final, verificou-se a quantidade de material e adicionou-se o dobro deste volume de Isopropanol gelado (400 µL). Após este procedimento as amostras foram incubadas a -20°C por uma noite. Depois da incubação, o material foi novamente centrifugado a 14000g por 30 min. a 4°C, e o produto formado foi lavado com 500µL de Etanol gelado 70% por 2 vezes, invertendo-se os tubos para lavar. Os tubos foram centrifugados por 10 min. a 14000g a 4°C, e o sobrenadante foi retirado. Em seguida, os tubos foram deixados na bancada em temperatura ambiente para secar o material. Depois de seco o material foi ressuspensado com 50µL de água miliQ autoclavada. Adicionou-se 5µL de RNase e os tubos foram deixados em bancada a temperatura ambiente por uma noite. No dia seguinte separaram-se alíquotas de 4µL de cada amostra para a quantificação em espectrofotômetro, e o restante do DNA foi congelado a -20°C. Após a quantificação do DNA presente em cada amostra, reservou-se um volume contendo 10µg de DNA para ser utilizado na Etapa 2.

Etapa 2 – Liofilização e hidrólise enzimática: Esta etapa tem a finalidade de hidrolisar as proteínas e separar o DNA do RNA. 20µg de DNA foram liofilizados em um microtubo de centrífuga durante uma noite com o auxílio de um liofilizador-centrifugador sob temperatura variável adaptado em série a uma bomba a vácuo e a um evaporador de resfriamento. O DNA liofilizado (20µg) foi dissolvido em água ultra

pura. Os tubos foram colocados em banho-maria à 100°C por 2 min. Após um rápido resfriamento em banho de gelo, foi adicionado a cada amostra: 2µL de tampão acetato de potássio 250mM (pH 5,4) , 2µL de sulfato de zinco 10mM e 4µL de nuclease P1 (6,25U/µL). Estes tubos foram incubados à 37°C por uma noite. No dia seguinte, uma segunda hidrólise enzimática foi realizada após a adição de 4µL de tampão Tris-HCl 0,5M (pH 8,3) e 4µL de fosfatase alcalina (0,31U/µL) a cada amostra. Em seguida, os tubos foram agitados por 2h a 37°C. Após a incubação foram adicionados 25µL de clorofórmio a cada amostra, para inativar as enzimas utilizadas na hidrólise. Os tubos foram centrifugados a 13000g por 10 min.

Etapa 3 - Quantificação da m⁵dC por HPCL: A quantificação da 5-metilcitosina foi efetuada por HPLC (HP1050 HPLC System), com uma coluna fenil Agilent Zorbax SB-Phenyl (250 x 4.6 mm, 5µm). A fase móvel utilizada foi uma mistura isocrática (NH₄)₂PO₄ 6,5 mM à pH 3,95 com metanol 4%. O fluxo de eluente foi de 1,0 mL/min. O volume de injeção foi de 20µL de uma diluição de 1/10 do DNA hidrolisado. O detector (HP1050 Series Variable Wavelength Detector) foi utilizado com comprimento de onda em 254nm. Os tempos de retenção da citosina e da 5-metilcitosina foram 3,8 min e 4,8 min., respectivamente. A porcentagem da metilação biológica de DNA apresentada através da taxa de m⁵dC foi calculada com a medição das áreas dos picos de citosina (dC) e 5-metilcitosina (m⁵dC), utilizando-se a seguinte fórmula: $m^5dC (\%) = (m^5dC / (m^5dC + dC)) * 100$

3.2.9 Lipoperoxidação: extração e quantificação do MDA

O método analítico para a quantificação do MDA foi realizado conforme Matias e Creppy (1998b), com algumas adaptações. Após a coleta dos eritrócitos dos peixes expostos aos lixiviados de resíduos industriais, foi realizada a centrifugação das alíquotas de 200µL de amostra sanguínea em 2000 RPM por 10 minutos, e utilizou-se o plasma obtido no processo. Foram utilizados 100µL de plasma de cada amostra, e adicionou-se 150µL de tampão SET, pH 8. Em seguida as amostras foram agitadas em um Vórtex. Retirou-se uma alíquota de 20µL do homogeneizado, que foi congelada para a posterior dosagem de proteínas pelo método de Bradford (ver item 3.3.10). Em seguida, foram preparadas oito amostras padrão de MDA de concentrações entre 7,5 e 6x10⁷ nM/mL. As amostras de plasma e os padrões foram tratados com

25µL de SDS 7%, 300µL de HCl 0.1 N, 40µL de ácido fosfotúngstico 1% e 300µL de ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) 0.67%. Após agitação no Vórtex, os tubos foram incubados a 90°C, durante 1 hora, no escuro, e depois resfriados com gelo durante 15 minutos. Adicionou-se 300µL de n-butanol e as amostras foram centrifugadas durante 10 minutos a 3000 RPM. A fase butanólica que contém o complexo MDA-TBA foi retirada e acondicionada em um outro tubo Eppendorf. A quantificação do MDA foi realizada por HPLC-fluorescência (HP1050 HPLC System). Empregou-se uma coluna Suplecosil LC-18 (250 x 4,6mm) de 5µm de porosidade. A fase móvel foi composta de metanol: água, 4:6 (v/v), corrida isocrática em pH controlado de 8.4 e o fluxo de eluente de 0,5mL/min. O volume de injeção foi de 50µL, e a detecção ocorreu por fluorescência, com o equipamento Programable fluorescence detector HP 1064A. O detector (Programmable Fluorescence Detector HP 1064A) foi utilizado com um comprimento de onda excitação de 515 nm, e com um comprimento de onda de emissão de 553nm.

3.2.10 Dosagem de proteínas

Para a dosagem de proteínas foi adotado o método de Bradford (Bradford, 1976). Nas amostras reservadas para este fim, foram adicionados 980µL do reativo Biorad diluído com água ultra-pura 1:4 (v/v). A solução foi homogeneizada e a absorbância medida a 595nm em um espectrofotômetro CARY 1E Varian - UV Visible Spectrophotometer. A concentração de proteínas nas amostras foi deduzida a partir de uma gama padrão de albumina bovina (BSA) como proteína padrão para a curva de calibração (ver Apêndice 5).

3.2.11 Análise estatística

A análise estatística dos ensaios de toxicidade específica foi realizada com os valores médios obtidos a partir de duas réplicas de cada amostra \pm o desvio-padrão. Em razão do pequeno número de dados, os resultados foram analisados por tipo de resíduo industrial, utilizando-se os testes de Dunnett ou o teste t com ajuste de Bonferroni (Dunnett, 1955) através do programa computacional Dunnett Program versão 1.5 (U.S.EPA, 1999), com ajuste de nível $\alpha < 0,05$.

3.3 MODELO WTox

3.3.1 Utilização dos dados toxicológicos no Modelo WTox.

Para os ensaios de toxicidade aguda com *Daphnia magna* e *Vibrio fischeri* utilizou-se os valores de CE₅₀ encontrados em cada teste.

Para os testes de toxicidade crônica com *Daphnia magna* foi empregada a porcentagem de aumento ou queda nos valores de fecundidade observada na CENO. Quando não foi possível obter o valor da CENO, utilizou-se o valor da CEO. A CENO é determinada como a maior concentração da amostra que não causa efeito estatisticamente significativo aos organismos quando comparado ao controle, nas condições de ensaio; e a CEO é definida como a menor concentração da amostra que causa efeito estatisticamente significativo nos organismos quando comparado ao controle, nas condições de ensaio (NBR 13373, 2003).

Nos testes de Lipoperoxidação, Fragmentação do DNA e Metilação do DNA, foi utilizada a porcentagem de aumento ou queda nos valores encontrados, em comparação com o controle negativo, independente de este valor ser estatisticamente significativo.

Para o teste do Micronúcleo foi utilizado o número de micronúcleos observados em cada amostra, independente de este valor ser estatisticamente significativo.

3.3.2 Utilização do Software WTox

O software WTox foi desenvolvido por Matias (2002) para automatizar algumas etapas da metodologia de classificação proposta pelo Modelo WTox. O primeiro passo é definir a variável toxicológica a ser avaliada no momento, por exemplo, CE₅₀ (%), e preencher o resultado encontrado para esta variável. O passo seguinte é definir a gravidade deste resultado. A experiência do profissional é fundamental para o correto julgamento da gravidade de cada parâmetro toxicológico. Logo depois, clica-se em “Incluir”. Assim, os resultados da variável são armazenados no sistema. Após esta etapa pode-se calcular o risco da variável selecionada clicando em “Calcular Risco” ou então adicionar os resultados encontrados em outra variável toxicológica.

A metodologia do modelo propõe que uma avaliação de risco completa deva incluir três parâmetros de toxicidade: um para verificar

efeitos agudos, um para verificar efeitos crônicos e um para verificar efeitos citotóxicos ou genotóxicos. Desta forma, o procedimento de inclusão de resultados de cada variável toxicológica se repete, até que todos os resultados da bateria de testes selecionada estejam armazenados no sistema. Em seguida clica-se em “Calcular Risco”, e o software calcula o risco ambiental para as variáveis selecionadas e automaticamente gera a classificação do risco para a amostra estudada. Na Figura 19 visualiza-se a janela inicial do software WTox.

Modelo WTox para Avaliar e Classificar Risco Ambiental Toxicológico

Ajuda

Cálculo de Risco Toxicológico | Estimativa de Impacto Ambiental | Adicionar Variável Toxicológica

Efeito Agudo: Variável Toxicológica: CE50 Gravidade: Incluir

Efeito Crônico: Variável Toxicológica: REPRODUCAO+ Gravidade: Incluir

Efeito Genotóxico: Variável Toxicológica: m5dC Gravidade: Incluir

Limpar Dados

Efeito	Valor	Organismo	Nível	Gravidade	Risco

Calcular Risco

Laboratório de Toxicologia Ambiental
ENS - UFSC

Figura 19 – Janela inicial do Software WTox.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste tópico são apresentados os resultados obtidos com o estudo de caso envolvendo a toxicidade de amostras de resíduos sólidos industriais. A calibração e a validação do Modelo WTox são demonstradas, assim como os resultados da análise de risco ambiental destas amostras através do software WTox.

4.1 TESTES DE TOXICIDADE COM *Daphnia magna* e *Vibrio fischeri*

Os resultados apresentados nos itens a seguir referem-se aos testes de toxicidade aguda e crônica com o organismo-teste *Daphnia magna*, e aos testes de toxicidade aguda com *Vibrio fischeri*.

Nos testes com *Daphnia magna* a faixa de pH recomendada para estes testes fica entre 5,0 e 9,0; e o Oxigênio dissolvido, nas diluições-teste, ao final do ensaio, deve ser maior ou igual a 2mg/L (Knie e Lopes, 2004). Neste trabalho o O₂ dissolvido foi medido apenas na fração solúvel bruta, e o pH não foi corrigido para que não houvesse alterações na amostra.

Nos testes com *Vibrio fischeri*, a faixa de pH recomendada para testes deve estar entre 6 e 8,5; caso a amostra não apresente um pH dentro desta faixa faz-se a correção para pH 7 (ISO 11348-3).

4.1.1 Sensibilidade do organismo-teste *Daphnia magna*.

O cultivo dos organismos-teste durante o período de execução dos testes (de abril a outubro de 2008) foi realizado com sucesso (Tabela 3), pois os resultados dos testes de sensibilidade realizados indicaram que a CE_{50,24h} média para a substância de referência dicromato de potássio esteve dentro do recomendado pelas normas internacionais (ISO 6341, 1996). De acordo com esta norma, a CE_{50,24h} para testes de sensibilidade com *Daphnia magna* deve estar entre 0,6 e 1,7 mg/L.

Na Tabela 3 pode-se visualizar os lotes utilizados nos testes de toxicidade aguda e crônica realizados com as frações solúveis de amostras de resíduos industriais.

Tabela 3 – Resultados dos testes de sensibilidade com microcrustáceos *Daphnia magna* de diferentes lotes, utilizados em cada teste de toxicidade realizado com as amostras de fração solúvel de resíduos industriais.

Amostras	Lote	Sensibilidade $CE_{50,24h}$
TX1 e TX2	149	0,99 mg/L
MM1 e MM3	153	0,98 mg/L
PP1 e TX3	162	0,92 mg/L
TX2 e PP2	166	0,95 mg/L
MM2 e PP3	168	0,82 mg/L

4.1.2 Sensibilidade do organismo-teste *Vibrio fischeri*

Os lotes de bactérias selecionados para os testes de toxicidade apresentaram $CE_{50,15min}$ e fator de correção (fk) dentro dos limites estabelecidos pela ISO 11348-3 (ISO, 2007), tornando viável a utilização destes lotes para a realização dos testes de toxicidade (Tabela 4). De acordo com a ISO 11348-3, para que o teste seja considerado válido, deve-se realizar previamente um teste de sensibilidade do lote com uma substância de referência. No presente trabalho utilizou-se o Sulfato de Zinco Heptahidratado ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) na concentração de 100 mg/L. A $CE_{50,15min}$ para o Sulfato de Zinco deve apresentar um valor entre 3 e 10 mg/L. Ainda, para que o teste seja considerado válido deve-se determinar o fator de correção para o controle (fk), de acordo com o tempo de exposição da bactéria. O fator de correção deve apresentar um valor entre 0,6 e 1,8. Na Tabela 4 pode-se visualizar os lotes utilizados nos testes de toxicidade realizados com as frações solúveis de amostras de resíduos industriais.

Tabela 4 – Resultados dos testes de sensibilidade com bactérias *Vibrio fischeri* de diferentes lotes, utilizados em cada teste de toxicidade realizado com as amostras de fração solúvel de resíduos industriais.

Amostras	Lote	Sensibilidade CE _{50,15min}	Fator de correção (fk)
TX2,MM2, MM3 e PP1	08E1031	5,398	0,6362
TX1, MM1 e PP2	08E1035	3,362	0,6113
TX3, TX4 e PP3	08E1038	3,799	0,6799

4.1.3 Ensaios de toxicidade aguda com *Daphnia magna* e *Vibrio fischeri*

Os resultados encontrados para os testes agudos com *Daphnia magna* e *Vibrio fischeri* estão reunidos na Tabela 5, onde podem ser observados os valores da CE_{50,48h} (%), CE_{50,30min} (%), pH e Oxigênio Dissolvido (mg/L) das amostras da fração solúvel de resíduos industriais.

Entre as frações solúveis das amostras de resíduos da indústria têxtil, os resultados dos testes de toxicidade aguda com *Daphnia magna* indicam que a amostra TX1 pode ser considerada de baixa toxicidade, a amostra TX2 não induziu toxicidade, a amostra TX3 induziu alta toxicidade e a amostra TX4 induziu toxicidade moderada. Em relação aos testes com *Vibrio fischeri*, os resultados indicam que a amostra TX1 não induziu à efeitos tóxicos, a amostra TX2 induziu toxicidade moderada, e a amostras TX3 e TX4 induziram toxicidade alta.

Tabela 5 – Resultados dos testes de toxicidade aguda com *Daphnia magna* e *Vibrio Fischeri* para fração solúvel de resíduos das indústrias Têxtil, Metal-mecânica e de Papel e Celulose.

Tipo Indústria	Amostra	<i>Daphnia magna</i> CE_{50,48h} (%)	<i>Vibrio fischeri</i> CE_{50,30min} (%)	pH	OD (mg/L)
Têxtil	TX1	70,71	NT	6,83	2,9
	TX2	NT	43,77	7,75	5,8
	TX3	11,26	12,08	7,71	4,0
	TX4	48,29	17,99	6,90	3,2
Metal-mecânica	MM1	84,86	73,86	8,89	4,3
	MM2	70,71	48,73	9,47	4,7
	MM3	2,21	17,47	6,9	5,8
Papel e Celulose	PP1	NT	91,93	6,72	4,1
	PP2	NT	19,00	8,17	5,6
	PP3	51,76	18,61	6,30	3,4

Notas: (NT) não tóxico.

Com os resultados encontrados observa-se que as frações solúveis de resíduos da indústria têxtil apresentaram toxicidade aguda bastante variada tanto para *Daphnia magna* como para *Vibrio fischeri*. De acordo com a Tabela 1, as frações solúveis dos resíduos da indústria têxtil analisadas neste trabalho, são compostas principalmente por bário, cádmio, cromo, ferro e zinco. A análise química da porção de peso seco destas amostras indica também a presença de cianetos e fenol, no entanto estas substâncias não foram analisadas na fração solúvel das amostras. As substâncias químicas presentes em misturas complexas podem interagir, provocando efeitos aditivos, sinérgicos ou antagônicos (Pavlaki et al., 2011; Cooper et al., 2009; Komjarova e Blust, 2008), e os resultados observados com os testes de toxicidade aguda neste estudo identificam estes efeitos. A amostra TX1 não induziu efeitos de toxicidade aguda importantes tanto para *D. magna* como para *V. fischeri*. A amostra TX2 não induziu efeitos de toxicidade aguda para o organismo *D. magna*. Estes resultados podem ser relacionados à eficiência da estação de tratamento ou à estabilização dos lodos TX1 e TX2 (Sponza e Isik, 2005; Rosa et al., 2007). Ainda, estes resultados podem ser relacionados com efeitos antagônicos entre cádmio, chumbo e zinco (Komjarova e Blust, 2008). Contudo, Soetaert et al. (2007) observou efeitos em nível molecular em *Daphnia magna* expostas à concentrações subletais de cádmio por 48h. Digestão, transporte de

oxigênio, metabolismo do exoesqueleto e o desenvolvimento de embriões foram afetados. Além disso, foram encontradas informações moleculares associadas a processos relacionados com resposta auto-imune, resposta ao estresse, adesão celular, percepção visual e transdução de sinais. Estes efeitos em nível molecular também podem ter ocorrido em *Daphnia magna* expostas à fração solúvel das amostras TX1 e TX2 no presente estudo, já que o cádmio é um metal que compõe este tipo de resíduo. Estas amostras não induziram efeitos de toxicidade aguda, mas após uma exposição às concentrações subletais é possível que ocorram efeitos em nível molecular. As amostras TX3 e TX4 induziram efeitos de toxicidade aguda nos dois organismos testados, e estes resultados podem ser relacionados à presença de metais como chumbo e zinco (Cooper et al., 2009). Apesar de não terem sido analisadas as concentrações de alumínio e fenol na fração solúvel das amostras, Rosa et al., (2007) afirmam que altas concentrações destas substâncias também podem causar efeitos de toxicidade aguda à *Daphnia magna*. Villegas-Navarro et al. (1999) afirmam que características físico-químicas de efluentes têxteis como dureza, condutividade e pH podem contribuir para induzir toxicidade à *Daphnia magna*. Grinevicius et al. (2009), afirmam que efeitos de toxicidade aguda observados em *Vibrio fischeri* expostas a efluentes têxteis podem estar relacionados com as altas concentrações de alumínio, magnésio, corantes, surfactantes, agentes de fixação e agentes branqueadores, que geralmente estão presentes nas diferentes etapas do processo na indústria têxtil.

Entre as frações solúveis de resíduos da indústria metal-mecânica, nos testes com *Daphnia magna* a amostra MM3 induziu o valor de toxicidade mais elevado entre todas as dez amostras analisadas. As amostras MM1 e MM2 induziram pouco efeito de toxicidade à *Daphnia magna*. A caracterização físico-química destes resíduos indica que os principais componentes da porção de peso seco são cloretos, cromo, ferro e zinco. Chumbo, cromo, níquel e zinco são também os principais componentes da fração solúvel destes resíduos (Tabela 1). O resíduo metal-mecânico identificado como amostra MM3 é proveniente do processo de galvanoplastia, e foi a amostra que induziu aos maiores efeitos de toxicidade aguda tanto para *D. magna* quanto para *V. fischeri*. Este resultado é semelhante ao observado por Seco et al. (2003), em *D. magna* expostas aos resíduos que contêm metais. Os pesquisadores relacionaram os efeitos de toxicidade ao zinco encontrado nestes resíduos. Os testes com *Vibrio fischeri* indicaram resultados variados em relação às amostras de fração solúvel de resíduos da indústria metal-mecânica. A amostra MM1 pode ser considerada pouco tóxica,

entretanto, a amostra MM3 induziu efeitos tóxicos importantes, sendo também considerada a mais tóxica entre as três amostras. A amostra MM2 induziu toxicidade moderada à *Vibrio fischeri*. A interação entre substâncias químicas como cromo, chumbo, níquel e zinco (Tabela 1) podem ter causados efeitos sinérgicos ou antagonísticos. Tsidiris (2006) observou CE_{50} de 1,50mg/L após exposição ao zinco e CE_{50} de 0,48 mg/L após exposição ao chumbo em *V. fischeri*. As amostras de frações solúveis da indústria metal-mecânica avaliadas no presente trabalho possuem concentrações de zinco e de chumbo de 1,45 mg/L e 0,24mg/L respectivamente. Com estes dados é possível relacionar os efeitos de toxicidade observados às interações entre metais que compõem os resíduos da indústria metal-mecânica. Picado et al. (2008) também observaram grande variedade na toxicidade à *V. fischeri* induzida por efluentes de uma indústria metal-mecânica, e relacionaram os resultados com a presença de hidrocarbonetos totais, óleos e graxas.

No presente trabalho, arsênio, chumbo, fenol e mercúrio são substâncias que compõem a porção de peso seco de resíduos da indústria de papel e celulose. Cádmiio, chumbo e cromo são os principais compostos presentes na fração solúvel destes resíduos. Novamente, é possível notar que a integração de compostos tóxicos pode causar efeitos sinérgicos ou antagonísticos aos organismos testados. As amostras PP1 e PP2, frações solúveis de resíduos da indústria de papel e celulose, não induziram efeitos de toxicidade para *Daphnia magna*, e a amostra PP3 induziu efeitos tóxicos moderados. A amostra PP3 induziu efeitos tóxicos à *D. magna* semelhantes aos encontrados por Picado et al. (2008). Estes pesquisadores encontraram $CE_{50,48h} = 51\%$, para *D. magna*, e a avaliação de alguns parâmetros físico-químicos indicou que a DBO, a DQO, SST e quantidade de óleos e graxas excediam os limites impostos por lei, o que pode ter contribuído para o valor de toxicidade observado. Estes fatores também podem ter contribuído para a toxicidade observada em *Daphnia magna* exposta à amostra PP3. Os resultados observados também podem ser relacionados com a presença das substâncias presentes na fração solúvel destes resíduos. Mesmo que a concentração de cada uma destas substâncias esteja abaixo dos limites impostos pela NBR 10004, os efeitos aditivos e sinérgicos podem ter sido responsáveis pela toxicidade observada (Cooper et al., 2009). Para *Vibrio fischeri* a amostra PP1 induziu efeitos pouco tóxicos, e as amostras PP2 e PP3 induziram efeitos tóxicos elevados. O chumbo pode ter causado os efeitos observados, pois Tsidiris et al. (2006) observaram uma CE_{50} de 0,48 mg/L após exposição ao chumbo em *V. fischeri*, e as amostras da indústria de papel e celulose possuíam uma concentração

em torno de 0,59 mg/L de chumbo em sua composição (Tabela 1). De acordo com Kostamo e Kukkonen (2003), altas concentrações de ácidos resínicos e esteróis nos efluentes da indústria de papel e celulose podem causar toxicidade elevada à *Vibrio fischeri*. A presença de ácidos resínicos e esteróis não foi investigada no presente trabalho, mas a presença de fenol na porção de peso seco pode ser um indício de sua presença também na fração solúvel, o que pode ter contribuído para os efeitos tóxicos observados.

As substâncias que compõem os resíduos industriais podem gerar efeitos relacionados com o metabolismo dos organismos expostos. De Coen e Janssen (1997), afirmam que concentrações subletais de cádmio, cromo e mercúrio podem alterar a atividade enzimática digestiva em *Daphnia magna* após uma exposição aguda. Os pesquisadores afirmam que o aumento da atividade enzimática digestiva reflete uma forma de o organismo lidar com a redução de absorção de alimento causado por uma alteração na eficiência de assimilação do alimento. Estas substâncias estão presentes nos resíduos da indústria têxtil, metal-mecânica e de papel e celulose investigados no presente trabalho (Tabela 1), e podem ter alterado o metabolismo das *D. magna* expostas às frações solúveis destes resíduos industriais.

De maneira geral, todas as frações solúveis dos resíduos industriais estudados induziram toxicidade aguda aos organismos testados, e os resultados indicaram uma variação entre baixo efeito tóxico a efeito tóxico importante.

4.1.4 Testes de toxicidade crônica com *Daphnia magna*

Os resultados são apresentados através de tabelas, onde podem ser observadas as concentrações à que os organismos foram expostos, a média de neonatos por postura, e o desvio padrão da média para cada concentração. Considerou-se a reprodução como principal variável para avaliar os efeitos crônicos. Os dados obtidos de longevidade e crescimento dos organismos são apresentados na forma de um artigo científico, no Apêndice 9.

4.1.4.1 Estudo da fração solúvel de amostras de resíduos da indústria têxtil

A Tabela 6 apresenta os resultados referentes ao estudo dos efeitos sobre a reprodução de *Daphnia magna* expostas às frações solúveis de quatro resíduos provenientes de indústria têxtil, codificados como amostras TX1, TX2, TX3 e TX4.

Entre os organismos expostos às amostras TX1 e TX4, as médias de neonatos encontradas não foram significativamente maiores do que a do controle para nenhuma das concentrações testadas. Assim, nas concentrações testadas estas frações solúveis não induziram efeitos na reprodução de *Daphnia magna*. Considerou-se que a amostra TX1 tem CENO 50%, e a amostra TX4, CENO 1,56%. Entretanto, isto não significa que as amostras não são tóxicas. A amostra TX4, pode ser considerada muito tóxica, visto que foi necessário diluir bastante a amostra bruta para desenvolver o teste crônico. Entre os organismos expostos à amostra TX2, as médias de neonatos encontradas foram significativamente maiores do que a do controle para as concentrações 12,5 e 25%, portanto considerou-se CENO 6,25%. A amostra TX3 induziu efeito crônico significativo na reprodução de *D. magna* em todas as concentrações testadas. Como não foi possível determinar a CENO, considerou-se a CEO 0,78%, para posterior utilização como dado de toxicidade crônica no Modelo WT_{tox}.

Tabela 6 - Estudo da toxicidade crônica sobre a reprodução (número de organismos que reproduziram (n) e média \pm desvio padrão) de *Daphnia magna* expostas à diversas concentrações (%) de frações solúveis de resíduos provenientes de quatro indústrias têxteis, codificadas como amostras TX1, TX2, TX3 e TX4, por um período de exposição de 21 dias.

Amostra	Concentração (%)	n	Média \pm DP
TX1	Controle	10	21,9 \pm 4,17
	6,25	6	24,6 \pm 4,33
	12,5	4	27,91 \pm 3,05
	25	7	26,7 \pm 5,90
	50	8	26,24 \pm 4,30
TX2	Controle	10	21,9 \pm 4,17
	3,125	8	19,14 \pm 3,67
	6,25	6	30,09 \pm 5,45
	12,5	9	33,56 \pm 11,78*
	25	5	38,98 \pm 5,25*
TX3	Controle	10	19,11 \pm 2,54
	0,78	9	25,32 \pm 4,51*
	1,56	8	30,91 \pm 3,71*
	3,125	9	31,16 \pm 7,11*
	6,25	6	38,14 \pm 5,18*
TX4	Controle	10	20,66 \pm 3,03
	1,56	5	23,64 \pm 3,92
	3,125	7	22,72 \pm 7,22
	6,25	9	23,67 \pm 7,84
	12,5	5	16,8 \pm 3,27

Nota: (*) indica diferenças significativas entre os tratamentos (controle negativo e exposição à fração solúvel de resíduo) $\alpha > 0.05$

Entre os organismos expostos à amostra TX2 é interessante observar que as concentrações que apresentaram aumentos significativos na reprodução foram as mesmas que apresentaram grande mortalidade de organismos ao final do teste (ver Apêndice 9). Como os índices de reprodução são maiores que os de sobrevivência, isto mostra que a preservação da espécie foi ameaçada (Terra et al., 2008). Assim, este aumento na reprodução explicaria uma tentativa forçada de preservação da espécie.

Efeitos semelhantes aos induzidos pela amostra TX3 foram observados por Knops et al. (2001), onde *Daphnia magna* foram expostas a um surfactante catiônico, o cetiltrimetilamonio bromídeo (CTAB), e a reprodução aumentou consideravelmente, especialmente

nas concentrações mais altas do surfactante. Mesmo observando quedas no consumo de oxigênio e redução do tamanho corpóreo dos organismos, os pesquisadores não conseguiram relacionar estes fatores com os efeitos observados e, portanto, concluíram que a taxa metabólica das daphnias não foi alterada. Ainda assim, em testes crônicos, características biológicas como taxa de ingestão de algas, crescimento, tempo para a primeira progênie, tempo de incubação dos ovos e tamanho da ninhada sugerem o possível envolvimento de vários mecanismos de toxicidade, como o aumento do consumo de energia, a redução da aquisição de energia (através da inibição da atividade de enzimas digestivas), inibição da reprodução (através da inibição da vitelogenese), ou mesmo efeitos diretos sobre a carapaça (De Schaephelaere et al., 2007). Portanto, um aumento significativo na reprodução deve servir como alerta de risco ambiental. Os efeitos observados indicam o potencial de toxicidade da amostra TX3.

4.1.4.2 Estudo da fração solúvel de amostras de resíduos da indústria metal-mecânica

A Tabela 7 apresenta os resultados referentes aos efeitos sobre a reprodução de *D. magna* expostas às frações solúveis de três resíduos de indústria metal-mecânica, codificadas como amostras MM1, MM2 e MM3.

Nos organismos expostos à amostra MM1, as médias de neonatos significativamente maiores em relação ao controle foram as das diluições 1,56 e 1,04%, o que indica efeitos na reprodução da *D. magna* nestas duas diluições. Assim, considerou-se CENO 0,78%.

Para a amostra MM2 os resultados em relação à reprodução da *D. magna* demonstraram que na diluição 25% a média de neonatos foi significativamente maior que a média do controle e que na diluição 50% a média de neonatos foi significativamente menor que a média do controle. Portanto, considerou-se CENO 12,5%.

Organismos expostos à amostra MM3 apresentaram médias de neonatos significativamente maiores do que a do controle em todas as diluições. Como não foi possível determinar a CENO, considerou-se a CEO 0,52%, para posterior utilização no Modelo WTox.

Tabela 7 - Estudo da toxicidade crônica sobre a reprodução (número de organismos que reproduziram (n) e média \pm desvio padrão) de *Daphnia magna* expostas à diversas concentrações (%) de frações solúveis de resíduos provenientes de três indústrias metal-mecânicas, codificadas como amostras MM1, MM2 e MM3, por um período de exposição de 21 dias.

Amostra	Concentração (%)	n	Média \pm DP
MM1	Controle	10	18,98 \pm 2,58
	0,52	6	22,45 \pm 3,29
	0,78	8	20,09 \pm 4,69
	1,04	9	24,53 \pm 3,96*
	1,56	6	23,77 \pm 4,34*
MM2	Controle	10	15,34 \pm 3,30
	6,25	10	16,37 \pm 3,65
	12,5	10	20,11 \pm 5,19
	25	9	27,49 \pm 9,31*
	50	3	2,66 \pm 2,08*
MM3	Controle	10	16,23 \pm 2,58
	0,52	7	20,41 \pm 3,41*
	0,78	8	22,18 \pm 2,98*
	1,04	9	27,56 \pm 1,99*
	1,56	7	26,21 \pm 2,77*

Nota: (*) indica diferenças significativas entre os tratamentos (controle negativo e exposição à fração solúvel de resíduo) $\alpha > 0.05$

Os resultados observados após a exposição de organismos à diluição 50% da amostra MM2 indicam que, mesmo gerando quantidade significativamente menor de neonatos, todos os organismos apresentavam ovos na carapaça ao final do teste, indicando um possível atraso no desenvolvimento dos órgãos reprodutores de *D. magna*. Nas diluições 6,25 e 12,5% houve um pequeno aumento na média de neonatos, mas não foi significativamente maior que a média do controle. Efeitos similares na reprodução de *D. magna* foram observados por Brentano (2006), após exposição dos organismos à concentrações sub-agudas de lixiviados de um aterro sanitário tratado por um sistema de lagoas. Este mesmo efeito, descrito como hormese, foi observado por Rodriguez et al. (2006), onde as concentrações mais baixas de um efluente metal-mecânico induziram o aumento do número de neonatos de *Daphnia magna*, mas a concentração mais alta diminuiu a quantidade de neonatos gerados. Os pesquisadores encontraram metais como níquel, zinco, e cromo nos efluentes e a presença destas substâncias

pode ter influenciado nos efeitos da reprodução. A fração solúvel das amostras de resíduos da indústria metal-mecânica investigados no presente trabalho também é composta por estes mesmos metais, sendo que as quantidades de zinco são semelhantes à uma das amostras avaliadas por Rodriguez et al. (2006). Desta forma, é possível fazer uma relação entre a presença destes metais com os efeitos observados. Entretanto, Rodriguez et al. (2006), afirmam que os processos que levam à maior quantidade de neonatos gerados quando os organismos adultos estão em contato com baixas concentrações de poluentes devem ser analisados com mais profundidade. Assim, permanece como sugestão um estudo futuro para explicar esse fenômeno que ocorre no sistema de reprodução de *Daphnia magna*.

4.1.4.3 Estudo da fração solúvel de resíduos da indústria de papel e celulose

A Tabela 8 apresenta os resultados referentes aos efeitos sobre *D. magna* expostas às frações solúveis de três resíduos da indústria de papel e celulose, codificadas como amostras PP1, PP2 e PP3.

A amostra PP1 induziu aumento significativo na reprodução dos organismos expostos em todas as concentrações testadas, exceto na maior diluição, 100%. Como este resultado não pode ser utilizado para identificar a CENO da amostra, optou-se por empregar o valor da CEO 12,5% para posterior utilização como dado toxicológico no Modelo WTox. Para os organismos expostos à amostra PP2 nota-se que as médias de neonatos das concentrações 12,5, 25 e 50% foram maiores que a média de neonatos do controle. Já na diluição 100% a média de neonatos é significativamente menor que a do controle. Para a amostra PP2 também não foi possível obter o valor da CENO, assim o valor da CEO 12,5% foi utilizado para posterior utilização como dado toxicológico no modelo WTox.

Tabela 8 - Estudo da toxicidade crônica sobre a reprodução (número de organismos que reproduziram (n) e média \pm desvio padrão) de *Daphnia magna* expostas à diversas concentrações (%) de frações solúveis de resíduos provenientes de três indústrias de papel e celulose, codificadas como amostras PP1, PP2 e PP3, por um período de exposição de 21 dias.

Amostra	Concentração (%)	n	Média \pm DP
PP1	Controle	10	19,57 \pm 2,70
	12,5	9	33,27 \pm 5,15*
	25	10	28,96 \pm 6,15*
	50	8	29,32 \pm 6,57*
	100	6	24,34 \pm 9,10
PP2	Controle	10	19,49 \pm 3,89
	12,5	10	26,43 \pm 3,22*
	25	8	24,84 \pm 3,03*
	50	10	24,22 \pm 4,76*
	100	3	5,78 \pm 4,67*
PP3	Controle	10	9,20 \pm 1,74
	6,25	10	5,49 \pm 1,92*
	12,5	10	8,13 \pm 2,60
	25	8	6,81 \pm 3,50
	50	2	1,50 \pm 0,71*

Nota: (*) indica diferenças significativas entre os tratamentos (controle negativo e exposição à fração solúvel de resíduo) $\alpha > 0.05$

Os resultados encontrados para as amostras PP1 e PP2, indicam que ocorreu o efeito hormese. Middaugh et al. (1997), afirmam que o efeito hormese pode ser relacionado com componentes nutricionais presentes nos efluentes da indústria de papel e celulose. Dube e Culp (1997) afirmam que o tratamento biológico destes efluentes contém fósforo e carbono. Deste modo, podem-se relacionar os efeitos observados na reprodução de *Daphnia magna* expostas as amostras PP1 e PP2 com componentes nutricionais presentes nos resíduos da indústria de papel e celulose.

Nos organismos expostos à amostra PP3 os efeitos sobre a reprodução ocorreram na menor e na maior diluição da amostra, respectivamente 6,25 e 50%. Nestas concentrações a reprodução foi significativamente menor que a do controle. Considerou-se, portanto, o

valor da CEO 6,25% para posterior utilização como dado toxicológico no modelo WTox. Efeitos fisiológicos e hormonais também podem ser causados por substâncias endócrino-ativas. Estas substâncias fazem parte de diversos processos industriais, e na indústria de papel e celulose, compostos como esteróides, triglicerídeos e ácidos resínicos estão dissolvidos nos efluentes, sendo responsáveis por efeitos de toxicidade crônica (Xavier et al., 2005). Deste modo, verifica-se que os efeitos em nível crônico causados pelas frações solúveis de amostras de resíduos da indústria de papel e celulose podem ser provocados por múltiplos fatores.

Dentre todas as amostras analisadas observou-se efeito na reprodução na maioria dos organismos testados. Os efeitos das misturas em nível subletal são muito importantes já que exposições crônicas podem acontecer de forma contínua em ambientes naturais, podendo afetar a biota aquática (Cooper et al., 2009).

4.2 TESTES DE TOXICIDADE COM *Oreochromis niloticus*

Neste item apresentam-se os resultados encontrados para os testes de lipoperoxidação, teste do micronúcleo, teste da metilação do DNA, e teste da fragmentação do DNA, onde foi utilizado o peixe *Oreochromis niloticus* como organismo-teste. Após o período de exposição de 48h nenhum organismo testado apresentou sinais aparentes de intoxicação, conforme o recomendado na bibliografia consultada (Çavas e Ergene-Gozücara, 2003; Chen et al., 2001; Mishra e Mohanty, 2008; Wahbi et al., 2004). Entretanto, houve pouca quantidade de sangue coletado dos peixes expostos, assim, foram feitas algumas adaptações para o teste do micronúcleo, não sendo possível realizar duplicatas de cada amostra, portanto, a análise estatística deste teste não foi realizada.

4.2.1 Teste do micronúcleo

Os resultados deste teste estão apresentados na Tabela 9, onde se pode observar o número de micronúcleos contabilizados no controle negativo, controle positivo, e em cada amostra de fração solúvel de resíduo industrial. Como houve pouca quantidade de sangue coletado dos peixes expostos, e as lâminas para o teste do micronúcleo foram as

primeiras a serem preparadas após este procedimento, optou-se por preparar apenas duas e não quatro lâminas de sangue para cada organismo exposto. Assim, foi realizada a contagem de 1000 células em cada lâmina, resultando um total de 2000 células contabilizadas para cada organismo exposto.

Para o controle negativo foram encontrados 2 micronúcleos em 2000 células contabilizadas. No controle positivo, onde o peixe foi exposto a 2,5 mg/L de dicromato de potássio foram encontrados 31 micronúcleos.

Entre as frações solúveis de resíduos da indústria têxtil, todas as amostras induziram a formação de micronúcleos em *Oreochromis niloticus*, indicando a ocorrência de efeitos genotóxicos aos organismos. No peixe exposto à amostra TX1 foram contabilizados 12 micronúcleos. Para a amostra TX2 foram encontrados 9 micronúcleos. Para as amostras TX3 e TX4, foram contabilizados 7 micronúcleos.

Os peixes expostos às amostras de fração solúvel de resíduos da indústria metal-mecânica apresentaram as menores quantidades de micronúcleos observados entre os dez organismos testados. Para a amostra MM1 foram observados 4 micronúcleos, e para as amostras MM2 e MM3, foram encontrados 3 micronúcleos.

Entre as amostras de fração solúvel de resíduos da indústria de papel e celulose, os resultados foram mais variados, sendo que as amostras PP1 e PP3 induziram a formação de apenas 3 micronúcleos nas células observadas, enquanto que a amostra PP2 induziu a formação de 14 micronúcleos, um número considerado bastante alto se comparado com o resultados do controle negativo e das outras amostras do mesmo tipo de resíduo.

Tabela 9 – Estudo da frequência de micronúcleos em eritrócitos de peixes *Oreochromis niloticus* expostos por 48 horas à diversas concentrações (%) de frações solúveis de resíduos provenientes das indústrias Têxtil, Metal-mecânica e de Papel e Celulose.

Amostra	Concentração (%)	Nº de micronúcleos observados (2000 células)
Controle negativo	-	2
Ind. Têxtil	TX1	12,5
	TX2	25
	TX3	6,25
	TX4	12,5
Ind. Metal-mecânica	MM1	25
	MM2	25
	MM3	6,25
Ind. Papel e celulose	PP1	25
	PP2	25
	PP3	25
Controle positivo $K_2Cr_2O_7$	2,5 mg/L	31

Todos os peixes expostos às diversas concentrações de amostras de frações solúveis de resíduos industriais apresentaram quantidade maior no número de micronúcleos quando comparados ao organismo controle. O micronúcleo é o resultado da perda de fragmentos cromossômicos ou de cromossomos inteiros, podendo ser induzido por agentes que danificam diretamente o cromossomo, produzindo quebras, ou por agentes que afetam o fuso mitótico (Maluf e Erdtmann, 2003). Efluentes têxteis reprimem o número de regiões organizadoras de ativos nucleolares, reduzem a atividade transcricional de genes rRNA e inibem a atividade específica de nucléolos emparelhados em células de *O. niloticus* (Çavas e Ergene-Gozücara, 2003). No presente estudo, as amostras de resíduos da indústria têxtil foram as que induziram a maior quantidade de micronúcleos em eritrócitos de *Oreochromis niloticus*, o que sugere a ocorrência de quebras do fuso mitótico e uma existência prévia de alterações cromossômicas (Maluf e Erdtmann, 2003). Nestas amostras, a presença de metais como cádmio e cromo (Tabela 1) pode ter causado a indução de micronúcleos, já que estes compostos são agentes genotóxicos (Çavas et al., 2005; Norman et al., 2008). O efeito sinérgico da interação entre as substâncias que compõem os resíduos têxteis pode ainda ter aumentado o efeito genotóxico observado. Zhu et

al. (2004) observaram maior quantidade de micronúcleos em peixes expostos à uma mistura com baixas concentrações de cádmio e cromo, quando comparada à quantidade de micronúcleos observada em peixes expostos somente ao cádmio, ou somente ao cromo, em concentrações dez vezes maiores.

Os resíduos da indústria metal-mecânica foram os que induziram a menor quantidade de micronúcleos nos peixes expostos, apesar da presença de metais como chumbo, cromo, níquel e zinco na fração solúvel das amostras analisadas (Tabela 1). Quando comparamos o pequeno número de micronúcleos contabilizados após exposição a este tipo de resíduo com os contabilizados após exposição a resíduos têxteis (que também possuem Pb, Cr e Zn em sua composição), conclui-se que os poluentes podem ter sido metabolizados ou detoxificados pelos organismos, explicando a diferença nos resultados entre estes diferentes indivíduos da mesma espécie (Al-Sabti, 1995). Ainda, nota-se a presença do zinco em grande quantidade nas amostras de resíduos da indústria metal-mecânica, e estudos comprovam que em ratos, a presença de zinco protege o organismo dos efeitos carcinogênicos do cádmio (Walkees, 2003). Apesar de não ser detectada a presença de cádmio nas amostras, o zinco pode ter atuado como um protetor diante de efeitos de outras substâncias presentes nestes resíduos. Esta hipótese também explicaria a diferença entre o número de micronúcleos induzidos pelos resíduos da indústria têxtil, que possuem dez vezes menos zinco em sua fração solúvel (Tabela 1). Assim, pode-se supor que a interação entre os compostos de resíduos da indústria metal-mecânica produziram efeitos antagônicos, amenizando o potencial tóxico das amostras.

Entre os resíduos da indústria de papel e celulose, a amostra PP2 foi a que provocou a maior quantidade de micronúcleos observada entre todas as dez amostras testadas, 14 micronúcleos em 2000 células contabilizadas. Este número indica um aumento na troca de cromátides irmãs, e demonstra o potencial mutagênico dos resíduos da indústria de papel e celulose (Pacheco e Santos, 1999). Entretanto, as amostras PP1 e PP3 induziram pouca formação de micronúcleos, apenas 3 em 2000 células contabilizadas, o que pode ser explicado pela grande variedade na composição e toxicidade destas misturas (Pacheco e Santos, 1999).

4.2.2 Avaliação da lipoperoxidação pela quantificação do MDA

Os resultados encontrados mostram que o organismo controle negativo produziu $27,05 \pm 8,32$ nMoles de MDA/ mg de proteína, e para o controle positivo foram encontrados $168,09 \pm 58,15$ nMoles de MDA/ mg de proteína (Tabela 10). O valor encontrado para o controle positivo é significativamente maior em relação ao controle negativo, de acordo com o teste t com ajuste de Bonferroni ($\alpha < 0,05$).

As amostras de indústria têxtil apresentaram valores semelhantes entre as amostras TX1 e TX2, e entre as amostras TX3 e TX4. A concentração de MDA foi aumentada em torno de 400% para as amostras TX1 e TX2, e em 77,5 e 48,5% para as amostras TX3 e TX4 respectivamente, em relação ao controle negativo.

Para as frações solúveis de resíduos indústria metal-mecânica os aumentos na taxa de MDA foram de 390 e 360% para as amostras MM1 e MM3, e a amostra MM2 teve um aumento de 600% na taxa de MDA. Todas as amostras apresentaram um aumento na taxa de MDA significativamente maior que a do controle.

Entre as frações solúveis de resíduos da indústria de papel e celulose o aumento na taxa de MDA foi bastante variado, sendo um aumento de 106, 66 e 5% para as amostras PP1, PP2 e PP3, respectivamente. O aumento da taxa não foi significativo para nenhuma amostra.

Tabela 10 – Medida da taxa do MDA em peixes *Oreochromis niloticus* expostos por 48 horas à diversas concentrações (%) de frações solúveis de resíduos provenientes das indústrias Têxtil, Metal-mecânica e de Papel e Celulose. Os resultados são expressos em médias \pm desvio padrão em nMoles de MDA/ mg de proteína.

Amostra	Diluição		Taxa de MDA nM MDA/mg de proteína
Controle negativo	-		27,05 \pm 8,32
Ind. Têxtil	TX1	12,50%	132,360 \pm 27,55*
	TX2	25%	140,28 \pm 11,4 *
	TX3	6,25%	48,01 \pm 0,52
	TX4	12,50%	40,17 \pm 2,06
Ind. Metal-mecânica	MM1	25%	133,5 \pm 19,5 *
	MM2	25%	190,02 \pm 12,62 *
	MM3	6,25%	125,34 \pm 3,04 *
Ind. Papel e celulose	PP1	25%	55,77 \pm 6,25
	PP2	25%	44,93 \pm 4,5
	PP3	25%	28,56 \pm 1,97
Controle positivo K ₂ Cr ₂ O ₇	2,5 mg/L		168,09 \pm 58,15 *

Nota: (*) $\alpha < 0.05$

Os resultados do presente estudo evidenciam que lixiviados de resíduos sólidos industriais induzem aumento das taxas de MDA nos eritrócitos de *Oreochromis niloticus*. Os aumentos nas taxas de MDA observados no presente trabalho, após a exposição dos peixes à fração solúvel de resíduos da indústria têxtil, podem estar relacionados com processos oxidativos nas membranas celulares. Uz-Zaman et al. (2008), relacionaram o aumento nas taxas de MDA com uma pequena redução em taxas de colesterol dos peixes expostos à efluentes têxteis, e afirmam que a exposição ao efluente provocou uma sensibilização nas membranas plasmáticas (compostas por colesterol e ácidos graxos), devido ao rompimento físico-químico e fisiológico da homeostase. Portanto, as diferenças significativas observadas em relação ao controle após exposição dos organismos às amostras TX1 e TX2 podem ser associadas à oxidação do colesterol, o que poderia ter afetado a integridade das membranas celulares dos peixes.

Resíduos industriais possuem em sua constituição vários tipos de metais (Tabela 1), e diversos estudos indicam os efeitos dos metais na lipoperoxidação em órgãos e eritrócitos de peixes (Oakes e Van der Kraak 2003; Avci et al. 2005; Gopal et al. 2009; Osman et al. 2009; Garcia-Medina et al. 2010). Garcia-Medina et al. (2010), sugerem que os aumentos na taxa de MDA em plasma de *Cyprinus carpio* estão relacionados com a exposição ao alumínio. A presença deste metal não foi investigada em resíduos da indústria têxtil e de papel e celulose, e não foi detectada em resíduos da indústria metal-mecânica. Entretanto, de acordo com Rosa et al. (2007) este metal está presente em grandes quantidades nos resíduos da indústria têxtil, portanto, pode-se relacionar os aumentos nas taxas de MDA destas amostras com a presença do alumínio.

Osman et al. (2009), observaram aumentos em torno de 50% dos níveis de MDA em fígado, rins, músculo e brânquias de *Oreochromis niloticus* expostos ao cádmio. Este metal está presente nas frações solúveis de resíduos da indústria têxtil e de papel e celulose, em quantidades muito semelhantes (Tabela 1). Portanto, pode-se relacionar os resultados observados principalmente das amostras TX3, TX4, PP1 e PP2 (que induziram a aumentos similares nas taxas de MDA de *O. niloticus*) com a presença do cádmio.

Gopal et al. (2009), observaram aumentos nas taxas de MDA em brânquias, rins, músculo e fígado de *Cirrhinus mrigala* expostos ao níquel. O níquel é o componente principal das frações solúveis de resíduos da indústria metal-mecânica (Tabela 1), e a presença deste metal poderia explicar os aumentos nas taxas de MDA observados nestas amostras.

O cromo é um dos principais constituintes de resíduos da indústria têxtil e metal-mecânica (Tabela 1). Comparando-se os aumentos nas taxas de MDA induzidos pelas amostras TX1, TX2, MM1, MM2 e MM3 com o aumento da taxa de MDA observada no controle positivo, pode-se supor que a presença do cromo nestas amostras pode ter contribuído para os resultados observados.

Além dos metais, outros contaminantes podem ser os responsáveis por aumentos nas taxas de MDA em peixes. Avci et al. (2005), relacionaram a oxidação dos tecidos musculares de *Silurus glanis* coletados em um rio que recebe efluentes de uma indústria de refinaria de petróleo, com a presença de compostos como nitrogênio amoniacal, óleo e graxas, enxofre e fenol no efluente, e afirmam que estes compostos foram os responsáveis por danificar o sistema antioxidante. Óleos e graxas, e fenol estão presentes também na porção

de peso seco dos resíduos industriais estudados no presente trabalho (Tabela 1), e mesmo que a presença destas substâncias não tenha sido investigada na fração solúvel, não se pode descartar sua possível presença nas amostras. Assim, estes compostos poderiam ter causado alterações no sistema antioxidante dos peixes *Oreochromis niloticus*, explicando os aumentos na taxa de MDA observados.

Os peixes expostos à fração solúvel de resíduos da indústria de papel e celulose não apresentaram aumentos significativos nas taxas de MDA. Oakes e Van der Kraak (2003), observaram aumentos de 51,3 e 39,7% nas taxas de MDA em fígado de fêmeas e machos de *Catostomus commersoni* coletados em rios que recebem efluentes de indústria de papel e celulose, e estes aumentos também não foram considerados significativos. No entanto, os pesquisadores observaram que peixes expostos a estes efluentes apresentavam maiores quantidades de ferro livre, e isto foi relacionado à indução do estresse oxidativo. Em outro estudo, Oakes et al. (2003), observaram aumentos na taxa de lipoperoxidação em fígado e gônadas de *Catostomus commersoni* coletados nas mesmas áreas estudadas por Oakes e Van der Kraak (2003). Ainda que os pesquisadores não tenham conseguido relacionar estes aumentos com alterações na reprodução dos peixes, o fato destes aumentos terem sido observados em tecidos de órgãos reprodutivos alerta para o perigo de uma contaminação por resíduos da indústria de papel e celulose no ecossistema aquático.

Os aumentos nas taxas de MDA dos eritrócitos encontrados neste trabalho indicam que pode ter ocorrido uma perturbação nas membranas lipídicas das tilápias expostas às frações solúveis de resíduos industriais, em decorrência dos metais e de outros contaminantes presentes nas frações solúveis destes resíduos industriais.

4.2.3 Avaliação da metilação biológica do DNA pela quantificação da m⁵dC

O estudo da quantificação da 5-metilcitosina em eritrócitos de peixes expostos à fração solúvel de resíduos de indústria têxtil indica o aumento significativo da m⁵dC induzido por todas as amostras (Figura 20). Comparando-se ao controle, as amostras TX1, TX2 e TX3 induziram um aumento em torno de 300% nas taxas de m⁵dC, passando do valor de 3,82% no controle para valores de 15,49, 14,01 e 15,84%, respectivamente. Já a amostra TX4 induziu um aumento de

722,93% comparado ao controle, com um valor de 30,91% na taxa de m^5dC .

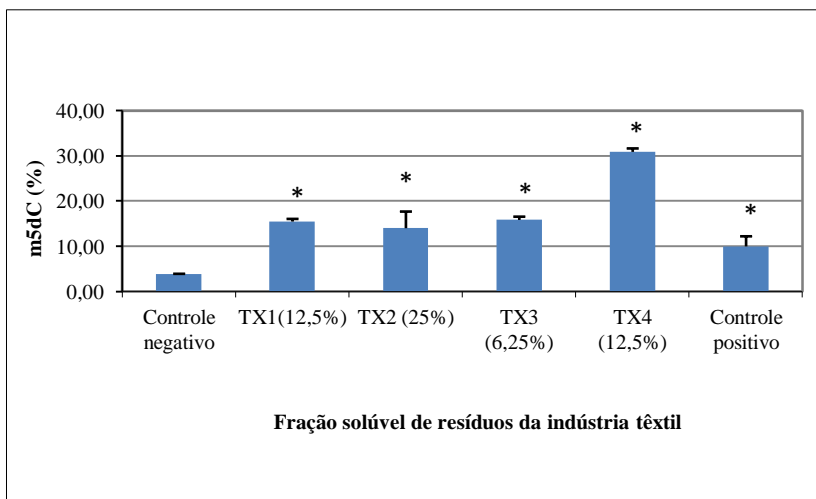


Figura 20 – Taxa da DNA-metilase ($m^5dC / (m^5dC + dC) * 100$), medida por HPLC, em amostras de eritrócitos de peixes *Oreochromis niloticus* expostos à fração solúvel de resíduos da indústria têxtil, ao controle positivo com dicromato de potássio (2,5 mg/L) e na ausência de contaminantes (controle negativo). Os valores representam a média entre cada réplica \pm desvio padrão (n=2). Nota: (*) $\alpha < 0,05$.

Entre os peixes expostos às frações solúveis de resíduos de indústria metal-mecânica, houve um aumento significativo induzido pela amostra MM3, onde a taxa de m^5dC aumentou de 3,82% no controle, para 10,64%, o que corresponde à um aumento de 183,24% quando comparado com o controle. Nos eritrócitos do organismo exposto à amostra MM2 o aumento foi de 59,63%, comparado ao controle. A taxa de m^5dC aumentou de 3,82% no controle, para 6,0%. A amostra MM1 foi a única que induziu queda no valor da m^5dC , 73,21% comparado ao controle, já que o valor da taxa de m^5dC observada foi de 1,01% (Figura 21).

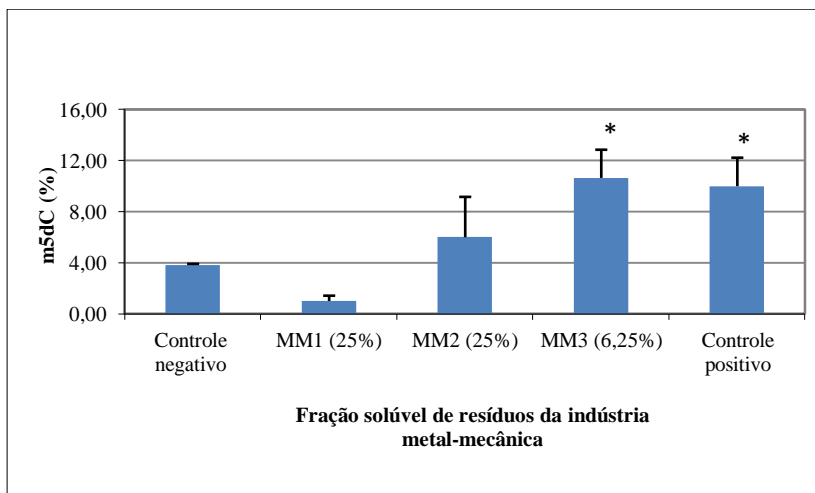


Figura 21 – Taxa da DNA-metilase ($m^5dC / (m^5dC + dC) * 100$), medida por HPLC, em amostras de eritrócitos de peixes *Oreochromis niloticus* expostos à fração solúvel de resíduos da indústria metal-mecânica, ao controle positivo com dicromato de potássio (2,5 mg/L) e na ausência de contaminantes (controle negativo). Os valores representam a média entre cada réplica \pm desvio padrão (n=2). Nota: (*) $\alpha < 0,05$.

Entre os peixes expostos às frações solúveis de resíduos da indústria de papel e celulose ocorreu um aumento da taxa de m^5dC de 288,49 e de 272,63% nos organismos expostos às amostras PP1 e PP3, respectivamente. As taxas de m^5dC em eritrócitos de *O. niloticus* expostos à estas amostras aumentaram de 3,82% no controle para 14,59 e 14,00%, respectivamente. No organismo exposto à amostra PP2 o aumento foi significativo, 471,52% comparado ao controle. O valor da taxa de m^5dC encontrado em eritrócitos do organismo exposto a esta amostra foi de 21,47% (Figura 22).

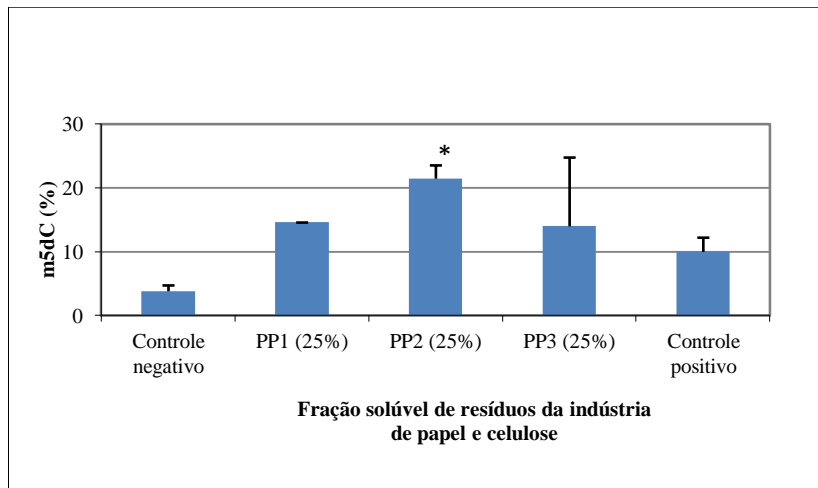


Figura 22 – Taxa da DNA-metilase ($m^5dC / (m^5dC + dC) * 100$), medida por HPLC, em amostras de eritrócitos de peixes *Oreochromis niloticus* expostos à fração solúvel de resíduos da indústria de papel e celulose, ao controle positivo com dicromato de potássio (2,5 mg/L) e na ausência de contaminantes (controle negativo). Os valores representam a média entre cada réplica \pm desvio padrão (n=2). Nota: (*) $\alpha < 0,05$.

Este estudo demonstra que a metilação do DNA no sangue de peixes *Oreochromis niloticus* é alterada pela exposição aos lixiviados de resíduos industriais. Houve hipermetilação significativa do DNA em eritrócitos de seis peixes expostos as frações solúveis de resíduos industriais (amostras TX1, TX2, TX3, TX4, MM3 e PP2). A hipermetilação está relacionada à exposição à metais como o cádmio e o arsênico (Li et al., 2009; Zhang et al., 2009). O cádmio é classificado como carcinogênico pelo *National Institute for Environmental Health Sciences*, e pode induzir efeitos genotóxicos e epigenéticos em nível molecular (Sabo-Attwood et al., 2006; Walkees, 2003). O arsênico é um poderoso agente carcinogênico que pode ser liberado para o meio ambiente durante diversos processos industriais (Sabo-Attwood et al., 2006). No presente trabalho, podem-se relacionar os efeitos de hipermetilação do DNA com o cádmio e o arsênico constituintes das frações solúveis de resíduos da indústria têxtil e de papel e celulose (Tabela 1). Ainda, pode-se relacionar os resultados encontrados após a exposição às amostras da indústria têxtil (TX1, TX2 e TX3) e metal-mecânica (amostra MM3), com os resultados encontrados para o controle positivo (dicromato de potássio). Os aumentos na taxas de

m^5dC induzidos por estas amostras e pelo dicromato de potássio foram muito semelhantes, assim, sugere-se que o cromo possa ter causado o efeito observado. O cromo está presente na fração solúvel de resíduos gerados nestas indústrias (Tabela 1), e isto pode explicar os aumentos nas taxas de m^5dC observados.

Houve apenas um caso onde a fração solúvel de resíduo industrial induziu hipometilação do DNA no organismo exposto (amostra MM1, resíduo da indústria metal-mecânica). O valor de decréscimo na metilação do DNA em eritrócitos de *O. niloticus* encontrado (70% comparado ao controle) assemelha-se ao maior valor de decréscimo de metilação encontrado por Wang et al. (2009). Os pesquisadores observaram queda em torno de 30 a 60% na metilação em fígado de peixes *Sebastiscus marmoratus* quando expostos à diversas concentrações de tributyltin (TBT), uma substância que pode estar presente em águas residuais urbanas e industriais, lodos de esgotos, e lixiviados de aterros sanitários. De acordo com Wilson et al. (2007), a hipometilação, desencadeada por substâncias químicas, pode predeterminar a iniciação de um tumor. Deste modo, é importante ressaltar o resultado encontrado após a exposição à amostra MM1, pois evidencia a influência da amostra na metilação biológica do DNA e no sistema de regulação. Mesmo que o valor da queda na taxa de m^5dC não tenha sido significativa, o potencial para indução de tumores provocados pela exposição à esta amostra deve ser considerado.

Semelhante à amostra MM1, as amostras MM2, PP1 e PP3 não induziram alterações significativas na metilação de *O. niloticus*. Aluru et al. (2010), observaram aumentos em torno de 20 e 30% na metilação em fígado de peixes *Fundulus heteroclitus* que vivem em uma área contaminada com PCBs, compostos muito utilizados em aplicações industriais, mas estes aumentos também não foram considerados significativos. Os pesquisadores relacionam estes resultados com a resistência a substâncias químicas adquirida de forma hereditária pelos peixes que habitavam a área, mas afirmam que os mecanismos que proporcionam a transmissão desta resistência ainda não estão completamente esclarecidos. Em um estudo utilizando *Daphnia magna*, Vandegheuchte et al. (2009a), observaram que, apesar da exposição ao zinco, não houve metilação significativa nos organismos da geração F0. Entretanto, notou-se que na geração F1 seguinte, os organismos apresentaram uma hipometilação significativa quando comparada com a F0; e a geração F2 apresentou uma hipermetilação significativa comparada com a F0. No presente trabalho, o zinco é o principal componente das frações solúveis de resíduos da indústria metal-

mecânica (Tabela 1), e, portanto, mesmo não sendo observadas alterações significativas na metilação do DNA, permanece o alerta para os efeitos que podem ocorrer nas gerações futuras dos organismos atingidos por este tipo de resíduo.

Os resultados deste estudo demonstram que os resíduos industriais podem alterar a metilação biológica do DNA e interferir no sistema de regulação, podendo iniciar um processo carcinogênico.

4.3 MODELO WTox

A utilização do modelo WTox, como um método seguro e confiável de análise de risco ambiental, só foi possível após a realização de duas etapas essenciais: a calibração e a validação do método. Na fase inicial de concepção do modelo, Matias (2002) sugeriu limites para cada parâmetro toxicológico selecionado, conforme dados coletados em diversos estudos do autor e também na bibliografia disponível. Como o método nunca havia sido utilizado para amostras de resíduos industriais, foi preciso realizar uma calibração nos parâmetros, ou seja, ajustar os limites de cada parâmetro toxicológico, baseando-se nos resultados encontrados em um estudo de caso com diversos testes de toxicidade, e também em referências bibliográficas específicas. Após esta etapa, foi necessário validar o método, comparando-se os resultados encontrados no presente estudo com metodologias já validadas. Assim, cada uma destas etapas é descrita nos tópicos a seguir.

4.3.1 Calibração do Modelo WTox

Para realizar a calibração do Modelo WTox, utilizou-se como base o intervalo de taxas proposto por Matias (2002) na fase de concepção do Modelo WTox. Em seguida, foi realizado um ajuste neste intervalo de taxas para cada parâmetro toxicológico, observando-se os resultados encontrados nos testes realizados com amostras de resíduos industriais, e observando-se resultados semelhantes encontrados na bibliografia.

Para os parâmetros de toxicidade aguda, toxicidade crônica (reprodução), metilação do DNA – hipermetilação (m^5dC +) e número de micronúcleos, não houve necessidade de realizar ajustes no intervalo de taxas propostas na concepção inicial do Modelo WTox. Os limites

iniciais (Quadro 2) corresponderam ao nível de toxicidade encontrado nos resultados de cada teste de toxicidade realizado. Mesmo assim, referências mais atuais foram coletadas e avaliadas, para assegurar o ajuste nos parâmetros toxicológicos (Apêndice A1).

Para os parâmetros lipoperoxidação (MDA) e metilação do DNA – hipometilação (m^5dC -) foi preciso realizar ajustes nos limites dos intervalos de taxas propostos na concepção do Modelo. Para a lipoperoxidação, foram considerados os aumentos nas amostras de resíduos da indústria de papel e celulose e um estudo de Avci et al. (2005). Para os resíduos da indústria de papel e celulose, aumentos de 106, 66 e 5% em relação ao controle negativo não foram considerados significativos, entretanto, no estudo de Avci et al. (2005), aumentos em torno de 115% nas taxas de MDA foram considerados significativos quando peixes *Silurus glanis* foram expostos a efluentes de uma indústria de refinaria de petróleo. Assim, definiu-se que apenas aumentos maiores que 120% seriam considerados de nível de toxicidade “A”. Nos resultados encontrados para o parâmetro da metilação do DNA, observou-se que houve uma queda em relação ao controle negativo, e isto não havia sido considerado na concepção inicial do modelo. Assim, foi observado o resultado da amostra MM1, que apresentou queda de 73,21% na taxa de m^5dC , e também considerou-se um estudo realizado por Wang et al. (2009). Estes pesquisadores observaram queda em torno de 30 a 60% na metilação em fígado de peixes *Sebastiscus marmoratus* quando expostos à diversas concentrações de tributyltin (TBT) uma substância presente em águas residuais urbanas e industriais, lodos de esgotos, e lixiviados de aterros sanitários. Desta forma, definiu-se que uma queda entre 80 e 100% na taxa de m^5dC em relação ao controle teria nível “A” de toxicidade.

Parâmetros Toxicológicos							
Nível	CE₅₀ (%)	Repr. (+ %)	Repr. (- %)	m⁵dC (+%)	m⁵dC (-%)	MDA (%)	Mn (n°)
A	< 5	> 100	80 – 100	> 100	80 – 100	> 120	> 20
B	5 - 10	60 – 100	50 – 80	70 – 100	50 – 80	90 – 120	10 – 20
C	10 - 30	30 – 60	20 – 50	30 – 70	20 – 50	60 – 90	5 – 10
D	30 - 60	10 – 30	10 – 20	10 – 30	10 – 20	30 – 60	2 – 5
E	60-100	0 – 10	0 – 10	0 – 10	0 – 10	0 – 30	0 – 2

Quadro 7 – Calibração do modelo WTox - Intervalo das taxas dos parâmetros toxicológicos.

4.3.2 Validação do Modelo WTox

Para obter a validação do Modelo WTox foi necessário, primeiramente, analisar os resultados dos testes toxicológicos empregados no presente trabalho realizando-se a avaliação de risco ambiental conforme o Modelo WTox. A avaliação de risco foi realizada com o auxílio do software WTox, para cada um dos seis testes de toxicidade utilizados neste estudo, e também a interação entre um conjunto de três testes, conforme sugerido pela metodologia do modelo.

Em seguida, foi indispensável fazer a comparação desta avaliação com resultados encontrados em outros modelos válidos. Para que fosse possível comparar metodologias, procurou-se utilizar modelos com estruturas semelhantes ao do Modelo WTox.

4.3.2.1 Aplicação da avaliação de risco com cada um dos seis parâmetros toxicológicos propostos pelo Modelo WTox

Conforme a metodologia de avaliação de risco proposta pelo Modelo WTox, e com o auxílio do software WTox, obteve-se o risco ambiental da amostra utilizando-se cada um dos seis parâmetros toxicológicos empregados. Aplicou-se os valores encontrados em cada teste de toxicidade e definiu-se a gravidade (Quadro 3) para cada parâmetro. Através do software, as etapas de verificação de nível de

toxicidade (Quadro 1) e de classificação de risco através da utilização da matriz de risco (Figura 2) se procedem de uma forma automática, ou seja, não é necessária a consulta à tabela e nem à matriz para classificar-se o risco. Seguindo-se estes mesmos passos obteve-se o risco ambiental para cada um dos parâmetros analisados em todas as amostras de resíduos industriais.

As frações solúveis de amostras da indústria têxtil (TX1, TX2 TX3 e TX4) apresentaram, de forma geral, Risco Significativo ou Crítico ao meio ambiente (Tabelas 11, 12, 13 e 14).

Tabela 11 – Análise de risco ambiental através do Modelo WTox, de acordo com os resultados observados na amostra TX1 (fração solúvel de resíduo da indústria têxtil).

Variável Toxicológica	Organismo	Valor	Nível de Toxic.	Gravidade	Risco
Teste Agudo (CE _{50,30min} %)	<i>V. fischeri</i>	100	E	IV	Marginal
Teste Agudo (CE _{50,48h} %)	<i>D. magna</i>	70,71	E	IV	Signif.
Teste Crônico (Reprodução %)	<i>D. magna</i>	19,82	D	III	Crítico
Liperoxidação (MDA %)	<i>O. niloticus</i>	389,32	A	II	Crítico
Metilação do DNA (m ⁵ dC %)	<i>O. niloticus</i>	312,24	A	II	Crítico
Micronúcleo (n ^o de Mn.)	<i>O. niloticus</i>	12	C	II	Crítico

Tabela 12 – Análise de risco ambiental através do Modelo WTox, de acordo com os resultados observados na amostra TX2 (fração solúvel de resíduo da indústria têxtil).

Variável Toxicológica	Organismo	Valor	Nível de Toxic.	Gravidade	Risco
Teste Agudo (CE _{50,30min} %)	<i>V. fischeri</i>	43,77	D	I	Marginal
Teste Agudo (CE _{50,48h} %)	<i>D. magna</i>	100.0	E	IV	Signif.
Teste Crônico (Reprodução %)	<i>D. magna</i>	37,4	C	II	Crítico
Liperoxidação (MDA %)	<i>O. niloticus</i>	418,59	A	II	Crítico
Metilação do DNA (m ⁵ dC %)	<i>O. niloticus</i>	272,97	A	II	Crítico
Micronúcleo (n ^o de Mn.)	<i>O. niloticus</i>	9	C	II	Crítico

Tabela 13 – Análise de risco ambiental através do Modelo WTox, de acordo com os resultados observados na amostra TX3 (fração solúvel de resíduo da indústria têxtil).

Variável Toxicológica	Organismo	Valor	Nível de Toxic.	Gravidade	Risco
Teste Agudo (CE _{50,30min} %)	<i>V. fischeri</i>	12,08	C	I	Crítico
Teste Agudo (CE _{50,48h} %)	<i>D. magna</i>	11,26	C	I	Crítico
Teste Crônico (Reprodução %)	<i>D. magna</i>	32,5	C	II	Crítico
Liperoxidação (MDA %)	<i>O. niloticus</i>	77,49	C	II	Crítico
Metilação do DNA (m ⁵ dC %)	<i>O. niloticus</i>	321,74	A	II	Crítico
Micronúcleo (nº de Mn.)	<i>O. niloticus</i>	7	C	II	Crítico

Tabela 14 – Análise de risco ambiental através do Modelo WTox, de acordo com os resultados observados na amostra TX4 (fração solúvel de resíduo da indústria têxtil).

Variável Toxicológica	Organismo	Valor	Nível de Toxic.	Gravidade	Risco
Teste Agudo (CE _{50,30min} %)	<i>V. fischeri</i>	17,99	C	I	Crítico
Teste Agudo (CE _{50,48h} %)	<i>D. magna</i>	48,29	D	I	Signif.
Teste Crônico (Reprodução %)	<i>D. magna</i>	14,42	D	II	Signif.
Liperoxidação (MDA %)	<i>O. niloticus</i>	48,5	D	II	Signif.
Metilação do DNA (m ⁵ dC %)	<i>O. niloticus</i>	722,93	A	II	Crítico
Micronúcleo (nº de Mn.)	<i>O. niloticus</i>	7	C	II	Crítico

Para as amostras MM1, MM2 e MM3 (frações solúveis de resíduo da indústria metal-mecânica) o risco ambiental definido pelo WTox varia entre Marginal, Significativo e Crítico (Tabelas 15, 16 e 17).

Tabela 15 – Análise de risco ambiental através do Modelo WTox, de acordo com os resultados observados na amostra MM1 (fração solúvel de resíduo da indústria metal-mecânica).

Variável Toxicológica	Organismo	Valor	Nível de Toxic.	Gravidade	Risco
Teste Agudo (CE _{50,30min} %)	<i>V. fischeri</i>	73,86	E	IV	Marginal
Teste Agudo (CE _{50,48h} %)	<i>D. magna</i>	84,86	E	IV	Marginal
Teste Crônico (Reprodução %)	<i>D. magna</i>	5,85	E	II	Marginal
Liperoxidação (MDA %)	<i>O. niloticus</i>	393,53	A	II	Crítico
Metilação do DNA (m ⁵ dC %)	<i>O. niloticus</i>	- 73,21	B	II	Crítico
Micronúcleo (n ^o de Mn.)	<i>O. niloticus</i>	4	D	II	Signif.

Tabela 16 – Análise de risco ambiental através do Modelo WTox, de acordo com os resultados observados na amostra MM2 (fração solúvel de resíduo da indústria metal-mecânica).

Variável Toxicológica	Organismo	Valor	Nível de Toxic.	Gravidade	Risco
Teste Agudo (CE _{50,30min} %)	<i>V. fischeri</i>	48,73	D	I	Signif.
Teste Agudo (CE _{50,48h} %)	<i>D. magna</i>	70,71	E	IV	Marginal
Teste Crônico (Reprodução %)	<i>D. magna</i>	31,10	C	II	Crítico
Liperoxidação (MDA %)	<i>O. niloticus</i>	602,48	A	II	Crítico
Metilação do DNA (m ⁵ dC %)	<i>O. niloticus</i>	59,63	C	II	Crítico
Micronúcleo (n ^o de Mn.)	<i>O. niloticus</i>	3	D	II	Signif.

Tabela 17 – Análise de risco ambiental através do Modelo WTox, de acordo com os resultados observados na amostra MM3 (fração solúvel de resíduo da indústria metal-mecânica).

Variável Toxicológica	Organismo	Valor	Nível de Toxic.	Gravidade	Risco
Teste Agudo (CE _{50,30min} %)	<i>V. fischeri</i>	17,47	C	I	Crítico
Teste Agudo (CE _{50,48h} %)	<i>D. magna</i>	2,21	A	I	Crítico
Teste Crônico (Reprodução %)	<i>D. magna</i>	25,75	D	II	Signif.
Liperoxidação (MDA %)	<i>O. niloticus</i>	363,36	A	II	Crítico
Metilação do DNA (m ⁵ dC %)	<i>O. niloticus</i>	183,24	A	II	Crítico
Micronúcleo (n ^o de Mn.)	<i>O. niloticus</i>	3	B	II	Signif.

Para as amostras PP1, PP2 e PP3 (frações solúveis de resíduo da indústria de papel e celulose) o risco ambiental definido pelo WTox também varia entre Marginal, Significativo e Crítico (Tabelas 18, 19 e 20).

Tabela 18 – Análise de risco ambiental através do Modelo WTox, de acordo com os resultados observados na amostra PP1 (fração solúvel de resíduo da indústria de papel e celulose).

Variável Toxicológica	Organismo	Valor	Nível de Toxic.	Gravidade	Risco
Teste Agudo (CE _{50,30min} %)	<i>V. fischeri</i>	91,93	E	IV	Marginal
Teste Agudo (CE _{50,48h} %)	<i>D. magna</i>	100,0	E	IV	Marginal
Teste Crônico (Reprodução %)	<i>D. magna</i>	70,0	B	II	Crítico
Lipoperoxidação (MDA %)	<i>O. niloticus</i>	106,17	B	II	Crítico
Metilação do DNA (m ⁵ dC %)	<i>O. niloticus</i>	288,49	A	II	Crítico
Micronúcleo (nº de Mn.)	<i>O. niloticus</i>	3	D	II	Signif.

Tabela 19 – Análise de risco ambiental através do Modelo WTox, de acordo com os resultados observados na amostra PP2 (fração solúvel de resíduo da indústria de papel e celulose).

Variável Toxicológica	Organismo	Valor	Nível de Toxic.	Gravidade	Risco
Teste Agudo (CE _{50,30min} %)	<i>V. fischeri</i>	19,0	C	I	Crítico
Teste Agudo (CE _{50,48h} %)	<i>D. magna</i>	100,0	E	IV	Marginal
Teste Crônico (Reprodução %)	<i>D. magna</i>	35,61	C	II	Crítico
Lipoperoxidação (MDA %)	<i>O. niloticus</i>	66,10	C	II	Crítico
Metilação do DNA (m ⁵ dC %)	<i>O. niloticus</i>	471,52	A	II	Crítico
Micronúcleo (nº de Mn.)	<i>O. niloticus</i>	14	B	II	Crítico

Tabela 20 – Análise de risco ambiental através do Modelo WTox, de acordo com os resultados observados na amostra PP3 (fração solúvel de resíduo da indústria de papel e celulose).

Variável Toxicológica	Organismo	Valor	Nível de Toxic.	Gravidade	Risco
Teste Agudo (CE _{50,30min} %)	<i>V. fischeri</i>	18,61	C	I	Crítico
Teste Agudo (CE _{50,48h} %)	<i>D. magna</i>	51,76	D	I	Signif.
Teste Crônico (Reprodução %)	<i>D. magna</i>	- 40,33	C	II	Crítico
Liperoxidação (MDA %)	<i>O. niloticus</i>	5,58	E	II	Marginal
Metilação do DNA (m ⁵ dC %)	<i>O. niloticus</i>	272,63	A	II	Crítico
Micronúcleo (n° de Mn.)	<i>O. niloticus</i>	3	D	II	Signif.

As avaliações de risco dos resíduos analisados indicam que, para pelo menos um dos parâmetros toxicológicos, todas as amostras apresentaram Risco Ambiental Toxicológico Crítico. Dentre as 60 avaliações realizadas, 37 resultaram em Risco Crítico. O Risco Crítico engloba consequências como a morte celular ou do organismo, o que pode influenciar o equilíbrio da cadeia trófica. Ainda, o Risco Crítico está associado à efeitos que não causam morte celular ou do organismo, mas que podem influenciar o sistema reprodutivo do organismo, ou também, alterar processos em nível genético.

4.3.2.2 Aplicação da avaliação de risco com um conjunto de três parâmetros toxicológicos.

De acordo com a metodologia proposta pelo Modelo WTox, realiza-se a análise de risco ambiental com três testes de toxicidade. A utilização de um conjunto de três testes, deve incluir um teste para verificar efeito agudo (*Daphnia magna* ou *Vibrio fischeri*), um teste para verificar efeito crônico (*Daphnia magna*), e um teste para verificar efeitos específicos ao organismo (Liperoxidação, Indução de Micronúcleos e Metilação do DNA).

Utilizando-se uma bateria de três testes de toxicidade têm-se seis possíveis combinações de testes para obter uma avaliação de risco toxicológico. As possíveis combinações de testes estão demonstradas no Quadro 8:

Combinação de testes toxicológicos			
Combinação	Teste Efeito Agudo	Teste Efeito Crônico	Teste Efeito Específico em <i>Oreochromis niloticus</i>
D-D-Lpo	<i>Daphnia magna</i>	<i>Daphnia magna</i>	Lipoperoxidação
D-D-Mn	<i>Daphnia magna</i>	<i>Daphnia magna</i>	Indução de Micronúcleos
D-D-MetDNA	<i>Daphnia magna</i>	<i>Daphnia magna</i>	Metilação do DNA
V-D-Lpo	<i>Vibrio fischeri</i>	<i>Daphnia magna</i>	Lipoperoxidação
V-D-Mn	<i>Vibrio fischeri</i>	<i>Daphnia magna</i>	Indução de Micronúcleos
V-D-MetDNA	<i>Vibrio fischeri</i>	<i>Daphnia magna</i>	Metilação do DNA

Quadro 8 – Combinação de testes toxicológicos sugerido pelo método WTox.

Seguindo a sequência da combinação de testes do Quadro 10, é possível encontrar o risco ambiental de cada amostra de resíduo industrial. Os resultados encontrados em cada combinação de testes estão descritos a seguir, conforme o tipo de indústria.

4.3.2.3.1 Fração Solúvel de Resíduos da Indústria Têxtil

Para a amostra TX1, todas as possíveis combinações de 3 testes classificariam a amostra como de Risco Significativo, ou seja, é capaz de provocar alterações fisiológicas irreversíveis sem morte celular ou do organismo, porém induzindo patologias crônicas que poderão influenciar no sistema reprodutivo, na integridade da célula ou do DNA (Tabela 21).

Tabela 21 – Combinação de testes para Avaliação de Risco Ambiental da amostra TX1 (fração solúvel de resíduo da indústria têxtil) através do Modelo WTox.

Combinação de testes	Risco Ambiental Final
D-D-Lpo	Significativo
D-D-Mn	Significativo
D-D-MetDNA	Significativo
V-D-Lpo	Significativo
V-D-Mn	Significativo
V-D-MetDNA	Significativo

Para as amostras TX2 e TX3 todas as combinações de testes resultam na classificação Risco Crítico (Tabelas 22 e 23).

Tabela 22 – Combinação de testes para Avaliação de Risco Ambiental da amostra TX2 (fração solúvel de resíduo da indústria têxtil) através do Modelo WTox.

Combinação de testes	Risco Ambiental Final
D-D-Lpo	Crítico
D-D-Mn	Crítico
D-D-MetDNA	Crítico
V-D-Lpo	Crítico
V-D-Mn	Crítico
V-D-MetDNA	Crítico

Tabela 23 – Combinação de testes para Avaliação de Risco Ambiental da amostra TX3 (fração solúvel de resíduo da indústria têxtil) através do Modelo WTox.

Combinação de testes	Risco Ambiental Final
D-D-Lpo	Crítico
D-D-Mn	Crítico
D-D-MetDNA	Crítico
V-D-Lpo	Crítico
V-D-Mn	Crítico
V-D-MetDNA	Crítico

No caso da amostra TX4 apenas uma combinação de testes não classificaria o resíduo como Crítico (Tabela 24). A sequência de testes, Daphnia agudo – Daphnia crônico – Lipoperoxidação, resultaria em uma classificação de Risco Significativo.

Tabela 24 – Combinação de testes para Avaliação de Risco Ambiental da amostra TX4 (fração solúvel de resíduo da indústria têxtil) através do Modelo WTox.

Combinação de testes	Risco Ambiental Final
D-D-Lpo	Significativo
D-D-Mn	Crítico
D-D-MetDNA	Crítico
V-D-Lpo	Crítico
V-D-Mn	Crítico
V-D-MetDNA	Crítico

4.3.2.3.2 Fração Solúvel de Resíduos da Indústria Metal-mecânica

Para a amostra MM1, quatro combinações resultaram em **Risco Significativo**, e duas combinações resultaram em **Risco Reduzido** (Tabela 25).

Tabela 25 – Combinação de testes para Avaliação de Risco Ambiental da amostra MM1 (fração solúvel de resíduo da indústria metal-mecânica) através do Modelo WTox.

Combinação de testes	Risco Ambiental Final
D-D-Lpo	Significativo
D-D-Mn	Reduzido
D-D-MetDNA	Significativo
V-D-Lpo	Significativo
V-D-Mn	Reduzido
V-D-MetDNA	Significativo

Para a amostra MM2 apenas um tipo de combinação de três testes não resultaria na classificação Risco Crítico. Ainda assim, a combinação de testes Daphnia agudo– Daphnia crônico – Micronúcleo resultaria na classificação de **Risco Significativo**, o que já alertaria para possíveis efeitos tóxicos a nível global e específico desta amostra (Tabela 26).

Tabela 26 – Combinação de testes para Avaliação de Risco Ambiental da amostra MM2 (fração solúvel de resíduo da indústria metal-mecânica) através do Modelo WTox.

Combinação de testes	Risco Ambiental Final
D-D-Lpo	Crítico
D-D-Mn	Significativo
D-D-MetDNA	Crítico
V-D-Lpo	Crítico
V-D-Mn	Crítico
V-D-MetDNA	Crítico

Para a amostra MM3, todas as combinações de três testes resultariam em Risco Crítico (Tabela 27).

Tabela 27 – Combinação de testes para Avaliação de Risco Ambiental da amostra MM3 (fração solúvel de resíduo da indústria metal-mecânica) através do Modelo WTox.

Combinação de testes	Risco Ambiental Final
D-D-Lpo	Crítico
D-D-Mn	Crítico
D-D-MetDNA	Crítico
V-D-Lpo	Crítico
V-D-Mn	Crítico
V-D-MetDNA	Crítico

4.3.2.3.3 Fração Solúvel de Resíduos da Indústria de Papel e Celulose

Para a amostra PP1, as combinações de testes que empregavam o teste do micronúcleo classificaram a amostra como de Risco Significativo (Tabela 28). Todas as outras combinações resultaram em Risco Crítico.

Tabela 28 – Combinação de testes para Avaliação de Risco Ambiental da amostra PP1 (fração solúvel de resíduo da indústria de papel e celulose) através do Modelo WTox.

Combinação de testes	Risco Ambiental Final
D-D-Lpo	Crítico
D-D-Mn	Significativo
D-D-MetDNA	Crítico
V-D-Lpo	Crítico
V-D-Mn	Significativo
V-D-MetDNA	Crítico

Para a amostra PP2, todas as combinações de três testes resultariam na classificação de Risco Crítico (Tabela 29).

Tabela 29 – Combinação de testes para Avaliação de Risco Ambiental da amostra PP2 (fração solúvel de resíduo da indústria de papel e celulose) através do Modelo WTox.

Combinação de testes	Risco Ambiental Final
D-D-Lpo	Crítico
D-D-Mn	Crítico
D-D-MetDNA	Crítico
V-D-Lpo	Crítico
V-D-Mn	Crítico
V-D-MetDNA	Crítico

No caso da amostra PP3, o teste da Lipoperoxidação foi o responsável por definir um Risco Significativo (Tabela 30). Neste caso a lipoperoxidação praticamente não foi influenciada pela amostra, mas houveram alterações significativas em nível global, na mortalidade

(teste agudo com *Daphnia magna* e *Vibrio fischeri*) e na reprodução (teste crônico com *Daphnia magna*).

Tabela 30 – Combinação de testes para Avaliação de Risco Ambiental da amostra PP3 (fração solúvel de resíduo da indústria de papel e celulose) através do Modelo WTox.

Combinação de testes	Risco Ambiental Final
D-D-Lpo	Significativo
D-D-Mn	Crítico
D-D-MetDNA	Crítico
V-D-Lpo	Significativo
V-D-Mn	Crítico
V-D-MetDNA	Crítico

Fenske et al. (2006) afirmam que uma combinação de vários testes, utilizando organismos de diferentes níveis de complexidade, proporcionam resultados confiáveis para a avaliação da toxicidade em diversas partes do ecossistema. Da mesma forma, Pandard et al. (2006) afirmam que uma bateria de testes com organismos de diferentes níveis tróficos é mais adequada para estimar a ecotoxicidade de resíduos industriais e urbanos. Zurita et al. (2007) realizaram uma bateria de testes toxicológicos *in vivo* (*D. magna*, *V. fischeri* e *C. vulgaris*) e *in vitro* (dois tipos de células de peixes), observando efeitos através de 12 parâmetros. Os pesquisadores concluíram que um único bioensaio nunca irá proporcionar informações adequadas para uma avaliação ecotoxicológica.

No presente trabalho, fica evidente que uma bateria de testes toxicológicos é mais adequada para se avaliar o risco ambiental de resíduos industriais. Empregando-se a metodologia do Modelo WTox, confirma-se que um conjunto de três testes (um para verificar efeito agudo, um para verificar efeito crônico, e um para verificar efeitos específicos ao organismo) oferece resultados de classificação de risco mais completos quando comparado com a avaliação de risco que utiliza apenas um parâmetro toxicológico. Desta forma, pode-se considerar que a metodologia do Modelo WTox, que propõe a utilização de três testes toxicológicos (agudo, crônico e específico) mostra-se adequada para uma avaliação de risco toxicológico ambiental.

4.3.2.3 Comparação entre resultados obtidos com o WTox e outros modelos válidos

Devido ao fato de que existem poucos métodos com estrutura semelhante ao do Modelo WTox, não foi possível utilizar um único método em que fosse possível comparar todos os tipos de resíduos industriais. Portanto, as comparações foram realizadas de acordo com o tipo de resíduo e não somente com o tipo de modelo. Assim, foram selecionados três modelos diferentes, para avaliar separadamente o risco ou o perigo de poluentes industriais.

4.3.2.2.1 Fração Solúvel de Resíduos da Indústria Têxtil

Os efeitos das amostras de resíduos da indústria têxtil foram comparados aos efeitos observados por Tigini et al. (2011). Neste estudo, os autores avaliaram a toxicidade, a genotoxicidade e o risco ambiental de amostras simuladas de efluentes têxteis. Os pesquisadores realizaram testes de toxicidade com bactérias *Vibrio fischeri*, algas *Pseudokirchneriella subcapitata*, planta aquática *Lemna minor*, plantas terrestres *Cucumis sativus L.* e *Lepidium sativum L.*, e microcrustáceos *Daphnia magna*; e testes de genotoxicidade com bactérias *Salmonella typhimurium*. A bateria de testes toxicológicos não utiliza os mesmos organismos que o Modelo WTox propõe, mas assemelha-se por englobar testes com organismos de diferentes níveis tróficos, e incluir um teste de genotoxicidade.

Na avaliação de risco proposta por Tigini et al (2011), utiliza-se basicamente os dados de CE_{50} observados em cada teste de toxicidade. Estes dados são transformados em um índice que representa a toxicidade relativa do teste (TR), e em seguida este dado é incluído em outra fórmula que engloba todos as TR e as transforma em um índice que representa a toxicidade da bateria de testes (TRB). As diferenças essenciais do método são a inclusão de uma estatística corretiva ($C = 2$ se $CE_{50} > 100\%$; $C = 1$ se $CE_{50} < 100\%$); e o peso dado aos diferentes tipos de teste: mortalidade = 8; bioluminescência = 7; desenvolvimento = 6; reprodução = 5; crescimento = 4; genotoxicidade = 3; mutagenicidade = 2 e comportamento = 1. Estes valores são inseridos nas fórmulas para calcular os índices citados anteriormente. De acordo com a porcentagem de toxicidade encontrada no índice TRB é possível classificar o risco ambiental da amostra. Resumidamente, a classificação de risco proposta pelos pesquisadores pode ser observada no Quadro 9.

Toxicidade (valor de TRB)	Risco
< 5%	Insignificante
5 – 10%	Moderado
10 – 20%	Alto
20 – 50%	Muito alto
> 50%	Extremamente alto

Quadro 9 – Avaliação de risco ambiental proposta por Tigini et al. (2011).

Nas análises realizadas por Tigini et al. (2011), foram avaliados o risco ambiental de quatro amostras de efluentes têxteis. Pelo método de avaliação proposto, as amostras apresentaram valores de toxicidade (TRB) entre 10 e 40%, representando um risco ambiental que variou entre alto e muito alto. Mesmo sem gerar um número ou valor de toxicidade que possa ser comparado com o valor TRB, o método de classificação de toxicidade determinada pelo Modelo WTox (níveis de toxicidade – Quadro 1) pode ser comparado com o método de classificação de toxicidade proposta por Tigini et al. (2011). No presente trabalho as amostras de fração solúvel de resíduos têxteis apresentaram (na maioria dos testes de toxicidade realizados) uma classificação de toxicidade entre os níveis A, B, ou C; o que significa um potencial tóxico variando entre extrema, alta ou média toxicidade. Já a integração entre os parâmetros toxicológicos resultou em Risco Significativo ou Crítico. Assim, quando empregamos os resultados do presente estudo na metodologia proposta por Tigini et al (2011), observa-se que a indicação de risco ambiental é semelhante. Deste modo, pode-se considerar a avaliação de risco proposta pelo Modelo WTox como sendo válida, quando comparada com o modelo apresentado por Tigini et al. (2011).

4.3.2.2 Fração Solúvel de Resíduos da Indústria Metal-mecânica

Os resultados da classificação de risco observados para as amostras da indústria metal-mecânica foram comparados com a classificação de perigo ambiental proposta por Piva et al. (2011). Neste estudo, os pesquisadores desenvolveram um modelo de classificação muito semelhante ao WTox, pois fornece uma classificação de

periculosidade para cada parâmetro avaliado e ao final integra todos estes parâmetros em uma avaliação geral de periculosidade. Apesar de este modelo ser mais voltado para a avaliação de sedimentos, é possível fazer uma comparação entre os dois modelos já que no presente estudo foram utilizados resíduos sólidos industriais.

No modelo proposto por Piva et al. (2011), a avaliação do perigo se dá por quatro linhas de evidência, que são: 1) características químicas do sedimento (presença de metais e elementos traço, compostos orgânicos, tamanho do grão); 2) biodisponibilidade em peixes (observação da concentração de substâncias químicas em brânquias e fígado do organismo exposto); 3) biomarcadores (MDA, micronúcleos, perda da integridade do DNA) ; 4) bioensaios em laboratório (mutação/genotoxicidade, bioluminescência, crescimento, comportamento, reprodução e mortalidade). Cada parâmetro presente em cada uma das linhas de evidência possui pesos definidos. A integração é realizada de acordo com os resultados observados em cada linha de evidência. A classificação é separada em cinco níveis de perigo: ausente, leve, moderado, alto, severo. Apesar de o Modelo WTox não incluir as linhas de evidência 1 e 2, as linhas de evidência 3 e 4 são idênticas nos dois modelos. A distribuição de pesos é diferente, mas ainda assim, é possível fazer uma comparação entre as duas metodologias.

O estudo de caso realizado por Piva et al. (2011) avaliou o perigo ambiental de sedimento da indústria petroquímica, expondo enguias *Anguilla anguilla* ao sedimento de um rio que recebe efluentes deste tipo de indústria. Os autores afirmam que o sedimento contém grande quantidade de metais como ferro, chumbo e zinco, o que torna este material similar aos resíduos da indústria metal-mecânica avaliados no presente trabalho.

A avaliação da periculosidade do sedimento da indústria petroquímica, de acordo com cada linha de evidência, resultou em: 1) avaliação de características químicas: Perigo Severo; 2) avaliação da biodisponibilidade: Perigo Severo; 3) avaliação dos biomarcadores: Perigo Severo; 4) avaliação dos bioensaios: Perigo Alto. A integração de todas as linhas de evidência resultou em uma classificação de perigo Severo.

Quando comparamos este resultado com os observados no presente trabalho, com amostras da indústria metal-mecânica, nota-se que a classificação pode ser considerada bastante semelhante. Avaliando cada amostra de acordo com a linha de evidência tem-se a seguinte classificação de perigo (Tabela 31):

Tabela 31 – Classificação de perigo de resíduos da indústria metal-mecânica (amostras MM1, MM2 e MM3) de acordo com a metodologia proposta por Piva et al. (2011).

Amostra	Classificação do Perigo	
	Linha de evidência 3: Biomarcadores	Linha de evidência 4: Bioensaios
MM1	Alto e severo	Leve
MM2	Alto e severo	Leve, alto e severo
MM3	Alto e severo	Alto e severo

Como no presente estudo cada parâmetro é classificado individualmente, tem-se um maior número de classificações de perigo para cada linha de evidência. Entretanto, o resultado mais importante é o da integração de cada um destes parâmetros, o que resulta, no Modelo WTox, em risco Reduzido ou Significativo para a amostra MM1, risco Significativo ou Crítico para a amostra MM2 e risco Crítico para a amostra MM3. Pela metodologia de Piva et al. (2011), teria-se um perigo Leve ou Alto para a amostra MM1, perigo Alto ou Severo para a amostra MM2 e perigo Severo para a amostra MM3.

Piva et al. (2011), afirmam ainda que os resultados encontrados com a metodologia desenvolvida confirmam a possibilidade de investigar a complexidade de sedimentos através da integração de dados provenientes de abordagens multidisciplinares. Aplicando-se os dados observados no presente estudo (amostras de resíduos da indústria metal-mecânica) à esta metodologia obtém-se uma classificação de perigo semelhante à classificação proposta pelo Modelo WTox. Portanto, é possível afirmar que o Modelo WTox é válido para classificar o risco ambiental de amostras de resíduos da indústria metal-mecânica, quando comparada com o modelo apresentado por Piva et al. (2011).

4.3.2.2.3 Fração Solúvel de Resíduos da Indústria de Papel e Celulose

Os resultados observados para amostras de resíduos da indústria de papel e celulose foram comparados aos de Blaise e Ferard (2005). Os pesquisadores utilizam o Índice PEEP (*Potential Ecotoxic Effects Probe*) concebido por Constan (1993), para avaliar e comparar o potencial ecotóxico de efluentes industriais, entre eles os da indústria de papel e celulose. O Índice PEEP pode ser utilizado também para resíduos, utiliza uma escala de 0 a 10 para classificar o perigo do poluente industrial e uma bateria de ensaios toxicológicos e de

genotoxicidade. Os ensaios englobam testes agudos com bactérias *Vibrio fischeri*, algas *Selenastrum capricornutum*, microcrustáceos *Ceriodaphnia dubia*, e o organismo de água doce *Hydra attenuata*. Além destes testes ainda há o teste crônico (7 dias) de letalidade e reprodução com *Ceriodaphnia dubia*, o teste para detectar mudanças morfológicas em *Hydra attenuata* (96h), e testes de genotoxicidade com a bactéria *E. Coli*.

No modelo PEEP, a bateria de testes toxicológicos, apesar de não utilizar os mesmos organismos que o modelo WTox propõe, assemelha-se ao WTox por englobar testes com organismos de diferentes níveis tróficos, e ainda incluir um teste de genotoxicidade. Entretanto, uma diferença essencial entre os modelos é a utilização da variável Vazão (m^3/h), que não se faz necessária para o modelo WTox. Portanto, para comparar as duas metodologias simulou-se um valor de vazão para as amostras de fração solúvel de resíduo industrial do presente trabalho. Outra diferença entre os modelos é que o modelo PEEP considera a biodegradabilidade da amostra, e inclui este valor no somatório de unidade tóxicas encontradas nos teste. Devido à dificuldade para simular tal valor, a biodegradabilidade das amostras de resíduos industriais não foi considerada para comparação entre os modelos.

O método PEEP utiliza basicamente a concentração de efeito não observado (CENO) e a menor concentração de efeito observado (CEO) da amostra em cada teste e transforma este dado em uma unidade tóxica (Equação 1), que é posteriormente incluído em uma equação que engloba o somatório das unidades tóxicas e o valor da vazão da amostra (Equação 2). Assim, têm-se as fórmulas:

$$TC = (CENO * CEO)^{1/2} \quad (\text{Equação 1})$$

$$TU = 100\% \text{ v/v efluente} \div TC \quad (\text{Equação 2})$$

O índice PEEP é representado pela letra P, na fórmula que articula todos os dados encontrados nos testes de toxicidade e a vazão (Figura 31).

$$P = \log_{10} \left[1 + n \left[\frac{\sum_{i=1}^N T_i}{N} \right] Q \right]$$

Figura 31 – Fórmula do Índice PEEP (P).

Fonte: Blaise e Ferard (2005).

Os demais dados são representados na fórmula pelas seguintes letras:

P = valor numérico do PEEP

n = número de testes que exibiram resposta tóxica

N = número de testes aplicados

T = unidades tóxicas geradas por cada teste de toxicidade

Q = vazão do efluente (m³/h)

A classificação de toxicidade proposta pelo método PEEP varia entre praticamente não-tóxico à extremamente tóxico (Quadro 10).

Valores de PEEP (P)	Classificação de Toxicidade
< 1,99	Praticamente não-tóxico
2-2,99	Ligeiramente tóxico
3-3,99	Moderadamente Tóxico
4- 4,99	Altamente tóxico
> 5	Extremamente tóxico

Quadro 10 – Classificação de toxicidade de acordo com o Índice PEEP (P).

Fonte: Constan (1993).

Entre os 50 efluentes analisados pelos pesquisadores, 15 eram efluentes da indústria de papel e celulose e foram os que apresentaram os mais altos índices PEEP. Os valores encontravam-se entre 4 e 7,5, ou seja, os efluentes foram classificados como altamente à extremamente tóxicos. Mesmo sabendo que os testes de toxicidade aplicados no estudo de Blaise e Ferard (2005) não são os mesmos aplicados no presente estudo, buscou-se fazer uma comparação entre os dois métodos, fazendo-se uma simulação dos dados não observados no presente estudo, e adaptando os dados encontrados nos testes realizados. Valores de CENO, CEO e vazão foram simulados no presente trabalho, sendo possível encontrar o índice PEEP para cada amostra. Estabeleceu-se uma vazão de 3000 m³/h, pois esta foi a vazão utilizada pelos pesquisadores. Os outros detalhes da simulação podem ser conferidos no Apêndice 8. Na Tabela 32 podem ser observados os valores de PEEP

encontrados para as amostras de fração solúvel dos resíduos da indústria de papel e celulose.

Tabela 32 – Valores de PEEP (P) encontrados para amostras de fração solúvel dos resíduos da indústria de papel e celulose.

Amostra	Valor de PEEP (P)
PP1	4,83
PP2	6,45
PP3	6,65

De acordo com o Quadro 9, a amostra PP1 pode ser classificada como altamente tóxica, e as amostras PP2 e PP3 como extremamente tóxicas. Estes resultados são semelhantes aos encontrados pelos pesquisadores, já que entre as 15 amostras analisadas, todas apresentaram valores entre 4 e 7,5, e ainda, em dois testes realizados após vários meses, as análises indicaram que o efluente apresentou $P = 5,9$ e $P = 6,0$, respectivamente.

No estudo de Blaise e Ferárd (2005), os efluentes da indústria de papel e celulose são apontados como os principais responsáveis pela poluição da área em estudo, e alertam para a urgência na tomada de iniciativas para conter a poluição e melhorar a situação ambiental da área. Os pesquisadores afirmam que o método é eficiente para avaliar o perigo destas substâncias, e a partir destes dados analisar alternativas para proteção e conservação do ambiente aquático. Devido à proximidade de valores de índices PEEP quanto à classificação de toxicidade, e também à semelhança quanto ao alerta para o perigo e o risco ambiental de resíduos da indústria de papel e celulose é possível validar o Modelo WTox para este tipo de poluente industrial. A aplicação dos resultados dos estudos toxicológicos obtidos no presente estudo, quando utilizados nos dois modelos, reflete indicativos de risco ambiental muito semelhantes.

4.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para a proteção dos organismos aquáticos e do meio ambiente como um todo, propõe-se a utilização do Modelo WTox para avaliação de risco ambiental. A classificação de risco é realizada de uma maneira simples, utilizando-se três ensaios toxicológicos que evidenciam efeitos em nível global e em nível específico, com o emprego de duas ou três

espécies representantes da cadeia trófica: bactérias *Vibrio fischeri*, microcrustáceos *Daphnia magna* e peixes *Oreochromis niloticus*. O Modelo WTox pode ser utilizado também com uma bateria maior de testes toxicológicos. Quanto maior o número de testes mais completa é a avaliação do risco ambiental. Por este motivo, e também por diferenças entre a disponibilidade de equipamentos em cada laboratório, a metodologia permite a inclusão ou a troca de parâmetros toxicológicos. Isto faz com que o Modelo WTox seja bastante acessível, pois ele é flexível.

No presente estudo os resultados observados em relação aos efeitos da exposição de organismos à amostras de resíduos industriais permitem confirmar a primeira hipótese desta tese, que afirmava que “a predição de toxicidade de misturas complexas não pode ser avaliada apenas por análises físico-químicas, portanto ensaios toxicológicos são os mais adequados para avaliar efeitos adversos destas substâncias aos organismos aquáticos. Comparando-se os resultados encontrados com a caracterização físico-química dos resíduos estudados (disponibilizada nos laudos de classificação da NBR 10004), e também com outros estudos semelhantes que empregaram avaliação físico-química deste mesmo tipo de poluente, confirma-se que os ensaios toxicológicos são mais indicados, já que a resposta à exposição pode ser rapidamente demonstrada, sem a necessidade de utilização de técnicas para determinar a composição da amostra e, principalmente, por abordar efeitos sinérgicos e antagônicos de misturas complexas. Ainda, pode-se relacionar os resultados observados nos testes toxicológicos e o sistema de classificação de resíduos proposto pela Norma NBR 10004 (ABNT, 2004). Todos os resíduos estudados neste trabalho foram classificados pela NBR 10004 como resíduos Classe IIA, ou seja, resíduos não-inertes, que não apresentam característica de toxicidade. Os resultados observados confirmam o contrário, já que todos os resíduos apresentaram, para algum dos parâmetros toxicológicos, um potencial tóxico importante, e deveriam ser classificados como resíduos de Classe I (Resíduo Perigoso). Isto demonstra que o sistema de classificação da NBR 10004 pode subestimar o potencial tóxico de resíduos, o que pode levar à sérias consequências para o meio ambiente.

A hipótese 2 afirmava que “um modelo de avaliação de risco ambiental deve incluir a interação entre os resultados observados a níveis global e específico”. Na pesquisa realizada para encontrar modelos de avaliação de risco ambiental que incluem também dados toxicológicos, notou-se que a maioria deles considera a integração de efeitos globais e específicos. Entretanto, grande parte dos modelos

considera a inclusão de dados físico-químicos, de vazão de descarga ou de dados geológicos do compartimento ambiental. No Quadro 11 apresenta-se uma comparação entre o Modelo WTox e outros modelos de avaliação de risco ou perigo ambiental.

Modelos	Comparação entre informações incluídas em modelos de avaliação de risco				
	Toxicologia Global	Toxicologia Específica	Dados Físico-químicos	Dados de vazão	Dados geológicos do compartimento ambiental
WTox (Matias, 2002)	***	***	-	-	-
Tigini et al., 2011	***	*	-	-	-
Piva et al., 2011	***	***	+	-	-
PEEP (Constan, 1993)	***	*	-	+	-
AQUATOX (Park et al., 2008)	***	-	+	+	+
CREAM (Grimm et al., 2009)	***	?	+	?	+
DREAM (Reed e Hetland, 2002)	***	***	+	+	+

Quadro 11: Comparação entre informações incluídas em Modelos de Avaliação de Risco Ambiental.

Notas: (*) número de testes aplicados: * = 1; ** = 2; *** > 2. (-) não inclui. (+) inclui. (?) não definido.

Os resultados observados no presente trabalho indicam que uma avaliação de risco que utiliza efeitos toxicológicos globais e específicos como variável principal é mais adequada e representativa. Além de evidenciar fenômenos biológicos, apresenta resultados semelhantes aos modelos que utilizam variáveis físico-químicas. Assim, a aplicação de um modelo que não necessita a inclusão de dados físico-químicos, de vazão de descarga, ou dados geológicos do compartimento ambiental estudado é mais representativa, pois foca na interação entre substância tóxica e ser vivo. Desta forma, o modelo pode ser aplicado em qualquer cenário e em qualquer situação, independente da obtenção destes dados, reduzindo custos e tempo.

Em relação à hipótese 3 pode-se confirmar a afirmação: “o Modelo WTox é o mais adequado para avaliar o risco ambiental toxicológico de poluentes ambientais”. Comparando-se o Modelo WTox com outros modelos, foi possível observar que o Modelo WTox pode realizar uma avaliação de risco ambiental adequada e eficiente, com a utilização de uma bateria de 3 testes toxicológicos, sem ser necessária a utilização de outros dados, chegando a resultados semelhantes a outros modelos, perante uma mesma situação de risco ambiental.

5. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

Este estudo apresentou como objetivo principal, a aplicação do Modelo WTox para a realização de uma avaliação de risco ambiental toxicológica em amostras de resíduos industriais. Além disso, os ensaios de toxicidade empregados permitiram concluir que:

- As frações solúveis de resíduos industriais apresentaram toxicidade aguda bastante variada tanto para *Daphnia magna* como para *Vibrio fischeri*. O maior valor de toxicidade aguda para *Daphnia magna* foi induzido por uma amostra de resíduo da indústria metal-mecânica (amostra MM3). Para *Vibrio fischeri*, uma amostra de resíduo têxtil induziu maior toxicidade aguda entre todas as amostras testadas (amostra TX3).
- Duas amostras (TX1 e TX4, resíduos da indústria têxtil) não induziram efeitos crônicos significativos na reprodução de *Daphnia magna* nas concentrações testadas. Todas as outras amostras de resíduos induziram efeitos de toxicidade crônica.
- Todos os resíduos industriais estudados induziram a formação de micronúcleos em *Oreochromis niloticus*. Uma amostra de fração solúvel da indústria de papel e celulose (PP2) induziu a maior quantidade de micronúcleos entre todas as amostras testadas, sendo observados 14 micronúcleos.
- Foram observados aumentos significativos na concentração de MDA em todos os peixes *Oreochromis niloticus* expostos as amostras de resíduos da indústria metal-mecânica e à duas amostras de resíduos têxteis (TX1 e TX2). Apenas os resíduos da indústria de papel e celulose não induziram aumentos significativos no processo de lipoperoxidação dos organismos testados.
- Todos os tipos de resíduos industriais induziram alterações na metilação biológica do DNA, sendo que os resíduos têxteis foram os que apresentaram maiores aumentos nas taxas de m⁵dC, o que pode levar à efeitos epigenéticos nos organismos expostos.
- O estudo de caso com amostras de resíduos industriais forneceu os dados toxicológicos necessários para o ajuste dos limites dos parâmetros selecionados para o Modelo WTox, possibilitando a calibração do modelo.

- O estudo de caso com amostras de resíduos industriais permitiu a validação do Modelo WTox. Através da realização da avaliação de risco, e posterior comparação com outras metodologias válidas, as amostras de resíduos industriais selecionadas foram classificadas, em sua maioria, como de Risco Significativo ou de Risco Crítico para o meio ambiente.

A integração de dados toxicológicos é essencial para definir o risco associado à poluentes ambientais. Um programa computacional pode atuar como uma ferramenta que proporcione e facilite esta integração. Os resultados apresentados neste estudo confirmam que o Modelo WTox é capaz de realizar uma avaliação de risco ambiental adequada, baseada apenas em dados toxicológicos. Assim, o Modelo WTox pode ser utilizado como uma ferramenta auxiliar em processos de tomada de decisão que envolvam a preservação do meio ambiente e em situações de risco toxicológico ambiental.

Como recomendações para próximos trabalhos nesta área de pesquisa sugere-se:

- Realização dos mesmos tipos de testes toxicológicos com amostras de misturas complexas provenientes de outros processos industriais, e da indústria petroquímica.
- Inserção de outros tipos de testes de toxicidade global e específica à metodologia do Modelo WTox, para complementar a avaliação e classificação de Risco Toxicológico.
- Realização de avaliação de dados físico-químicos das amostras, a fim de enriquecer a discussão sobre os resultados encontrados.
- Aplicação do Modelo WTox em amostras de águas superficiais ou subterrâneas, contaminantes ambientais conhecidos (como toxinas produzidas por algas), e contaminantes em forma de nanopartículas.
- Melhorias na metodologia do Modelo WTox, permitindo a utilização de mais de três tipos de testes em uma mesma avaliação de risco.
- Melhorias no Software WTox, em relação a operação do programa.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 10004**: Resíduos sólidos – Classificação. Rio de Janeiro, 2004a.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 10005**: Lixiviação de Resíduos. São Paulo, 1987.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 10005**: Resíduos sólidos – Procedimento para obtenção de extrato lixiviado de resíduos sólidos. Rio de Janeiro, 2004b.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 10006**: Procedimento para obtenção de extrato solubilizado de resíduos sólidos. Rio de Janeiro, 2004c.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 10007**: Amostragem de Resíduos Sólidos. Rio de Janeiro, 2004d.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12713**: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia* spp (Crustacea, Cladocera). Rio de Janeiro, 2009.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 13373**: Ecotoxicologia Aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com *Ceriodaphnia* spp. (Crustacea, Cladocera). Rio de Janeiro, 2003.

AHMAD, I., HAMID, T., FATIMA, M., CHAND, H.S., JAIN, S.K., ATHAR, M., RAISUDDIN, S. Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus* Bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1523, p. 37-48, 2000.

ALI, M., SREEKRISHNAN, T.R. Aquatic toxicity from pulp and paper mill effluents: a review. **Adv. Environ. Res.**, v. 5, p. 175-196, 2001.

ALMEIDA, E.A., BAINY, A.C.D., LOUREIRO, A.P.M., MARTINEZ, G.R., MIYAMOTO, S., ONUKI, J., BARBOSA, L.F., GARCIA,

C.C.M., PRADO, F.M., RONSEIN, G.E., SIGOLO, C.A., BROCHINI,C.B., MARTINS, A.M.G., MEDEIROS, M.H.G., DI MASCIO, P. Oxidative stress in *Perna perna* and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: Antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage. **Comp. Biochem. Physiol. A**, v. 146, p. 588-600, 2007.

AL-SABTI, K. An in vitro binucleated blocked hepatic cell technique for genotoxicity testing in fish. **Mutat. Res.**, v. 335, p. 109-120, 1995.

ALURU, N., KARCHNER, S.I., HAHN, M.E. Role of DNA methylation of AHR1 and AHR2 promoters in differential sensitivity to PCBs in Atlantic Killifish; *Fundulus heteroclitus*. **Aquat. Toxicol.**, v. 101. n. 1, p. 288-294, 2011.

ANIAGU, S.O.,WILLIAMS, T.D., ALLEN,Y., KATSIADAKI, I., CHIPMAN, J.K. Global genomic methylation levels in the liver and gonads of the three-spine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) after exposure to hexabromocyclododecane and 17- β oestradiol. **Environ. Int.**, v. 34, p. 310–317, 2008.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION – APHA; AWWA; WPCF. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 21^a ed. Washington: APHA, 2005.

ARAGÃO, M.A., ARAÚJO, R.P.A. Métodos de ensaios de toxicidade com organismos aquáticos. In: ZAGATTO, P.A., BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações**. São Carlos: RiMa, 2006.

AUGUSTO, L.G.S., FREITAS, C. M. O Princípio da Precaução no uso de indicadores de riscos químicos ambientais em saúde do trabalhador. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 3. n. 2, p. 85-95, 1998.

AVCI, A., KAÇMAZ, M., DURAK, I. Peroxidation in muscle and liver tissues from fish in a contaminated river due to a petroleum refinery industry. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 60, p. 101-105, 2005.

AZUR ENVIRONMENTAL. Microtox Manual (1– 4). 1997.
Disponível em:

www.sdix.com/uploadedFiles/Content/Products/Water_Quality_Tests/MicrotoxOmni-Software-forWindows.pdf> Acesso em 27 nov. 2010.

BASSOI, L. J.; NIETO, R.; TREMAROLI, D. **Implementação de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos**. São Paulo: CETESB, 1990.

BARDAKCI, F., SKIBINSKI, D.O.F. Application of the RAPD technique in tilapia fish: species and subspecies identification. **Heredity**, v. 73, p. 117-123, 1994.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BAUDO, R. Ecotoxicological testing with *Daphnia*. **Mem. Ist. Ital. Idrobiol.**, v. 45, p. 461-482, 1987.

BIANCHINNI, A., WOOD, C.M. Physiological effects of chronic silver exposure in *Daphnia magna*. **Comp. Biochem. Physiol. C**, v. 133, p. 137-145, 2002.

BLAISE, C., FÉRARD, J.-F. Effluent assessment with the PEEP (Potential Ecotoxic Effects Probe) index. In: BLAISE, C., FÉRARD, J.-F. **Small-scale Freshwater Toxicity Investigations**. Dordrecht: Springer, 2005. v.2, p. 69-88.

BOLOGNESI C.; PERRONE, E.; ROGGIERI, P.; M. PAMPANIN D. M.; SCIUTTO, A. Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish exposed to xenobiotics under controlled conditions. **Aquat. Toxicol.**, v. 78, p. 93- 98, 2006.

BRENTANO, D. M. **Desenvolvimento e aplicação do teste de toxicidade crônica com *Daphnia magna*: avaliação de efluentes tratados de um aterro sanitário**. 2006. 145 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

BRILHANTE, O.M. Gestão e avaliação da poluição, impacto e risco na saúde ambiental. In: BRILHANTE O. M., CALDAS L. Q. A. **Gestão e Avaliação de Risco em Saúde Ambiental**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ,

1999.

CALDAS, L.Q.A. Risco Potencial em Toxicologia Ambiental. In: BRILHANTE O. M., CALDAS L. Q. A. **Gestão e Avaliação de Risco em Saúde Ambiental**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1999.

CARRANO, A.V., NATARAJAN, A.T. Considerations for populations monitoring using cytogenetic techniques. **Mutat. Res.**, v. 204, p. 379–406, 1988.

CARVALHO PINTO-SILVA, C.R., FERREIRA, J.F., COSTA, R.H.R., BELLI FILHO, P., CREPPY, E.E., MATIAS, W.G. Micronucleus induction in mussels exposed to okadaic acid. **Toxicol.**, v. 41, p. 93–97, 2003.

CASTRO, A.L.C. **Glossário de Defesa Civil: Estudos de Riscos e Medicina de Desastres**. 2ª Ed., Brasília - DF, Ministério do Planejamento e Orçamento, 1998.

ÇAVAS, T., ERGENE-GÖZÜKARA, S. Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) as cyto-genotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent. **Mutat. Res.**, v. 538, p. 81-91, 2003.

ÇAVAS, T., GARANKO, N.N., ARKHIPCHUK, V.V. Induction of micronuclei and binuclei in blood, gill and liver cells of fishes subchronically exposed to cadmium chloride and copper sulphate. **Food Chem. Toxicol.**, v. 43, p. 569-574, 2005.

CHANDRA, S., CHAUHAN, L. K. S., MURTHY, R. C., SAXENA, P. N., PANDE, P. N., GUPTA, S. K. Comparative biomonitoring of leachates from hazardous solid waste of two industries using Allium test. **Sci. Total Environ.**, v. 347, p. 46-52, 2005.

CHASIN, A.A.M., AZEVEDO, F.A. Introdução e Avaliação da Toxicidade. In: AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. da M. **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. São Carlos: RiMa, 2003. p. 127- 165.

CHEN, C.-M., YU, S.-C., LIU, M.-C. Use of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) and Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) in toxicity tests on

different industrial effluents in Taiwan. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 40, p. 363-70, 2001.

CHU, S.P. The influence of the mineral composition of the medium on the growth of planktonic algae. **J. Ecol.**, v. 30, p. 284–325, 1942.

COMMITTEE ON ENVIRONMENT AND NATURAL RESOURCES OF THE NATIONAL SCIENCE AND TECHNOLOGY COUNCIL. **CENR/5-99/001: Ecological Risk Assessment in the Federal Government.** Washington: Executive Office of the President, 1999.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Avaliação da Toxicidade de despejos industriais na região da Grande São Paulo.** São Paulo: CETESB, 1987.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Identificação de perigos.** São Paulo: CETESB, 2008.

Disponível em:

http://www.cetesb.sp.gov.br/emergencia/riscos/estudo/etapas_identificacao.asp. Acesso em 15 set. 2008.

CONSTAN, G., BERMINGHAM, N., BLAISE, C., FÉRARD, J.F. Potential ecotoxic effects probe (PEEP): a novel index to assess and compare the toxic potential of industrial effluents. **Environ. Toxicol. Water Qual.**, v. 8, p. 115-140, 1993.

COOPER, N. L., BIDWELL, J. R., KUMAR, A. Toxicity of copper, lead, and zinc mixtures to *Ceriodaphnia dubia* and *Daphnia carinata*. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** v. 72. n.5, p. 1523-1528, 2009.

COSTA M. V.; CHAVES, P. S. V.; OLIVEIRA, F. C. Uso das técnicas de avaliação de impacto ambiental em estudos realizados no Ceará. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIAS DA COMUNICAÇÃO, 28, 2005. Rio de Janeiro. **Anais do XXVIII Congresso Brasileiro de Ciências da Comunicação.** Rio de Janeiro: Intercom, Setembro de 2005. p. 1-15.

DE COEN, W.M., JANSSEN, C.R. The use of biomarkers in *Daphnia magna* toxicity testing: Digestive enzyme activity in *Daphnia magna*

exposed to sublethal concentrations of cadmium, chromium and mercury. **Chemosphere**, v. 35. n. 5, p. 1053–1067, 1997.

DE SCHAMPHELAERE K.A.C., DE FORREZ I., DIERCKENS K., SORGELOOS P., JANSSEN, C.R. Chronic toxicity of dietary copper to *Daphnia magna*. **Aquat. Toxicol.**, v. 81, p. 409–418, 2007.

DEUTSCHES INSTITUTE FÜR NORMUNG. **DIN 38412**: testverfahren mit Wasserorganismen (gruppeL) Bestimmung der nicht akut giftigen Wirkung von Abwasser gegenüber Daphnien über Verdünnungsstufen. Berlin, 1989.

DUBE, M.G., CULP, J.M. Growth responses of periphyton and chironomids exposed to biologically treated bleached kraft pulp mill effluent. **Water Sci. Technol.**, v. 35. n. 2-3, p. 339-345, 1997.

DUNNETT, C. W. A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. **J. Am. Stat. Assoc.**, v. 50, p. 1096-1121, 1955.

ESTELLER M. Relevance of DNA methylation in the management of cancer. **Lancet Oncol**, v. 4, p. 351–359, 2003.

ERDTMANN, B. A genotoxicidade nossa de todos os dias. In: SILVA, J., ERDTMANN, B., HENRIQUES, J.A.P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Editora Alcance, 2003. p. 21- 46.

FAIRMAN, R., MEAD, C.D., PETER WILLIAMS, W. **Environmental Risk Assessment - approaches, experiences and information sources**. Copenhagen, EEA - European Environment Agency, 1998. Disponível em:
<http://reports.eea.europa.eu/GH-07-97-595-EN-C2/en/riskindex.html>.
Acesso em: 20 set. 2008.

FENSKE, C., DAESCHLEIN, G., GÜNTHER, B., KNAUER, A., RUDOLPH, P., SCHWAHN, C., ADRIAN, V., VON WOEDTKE, T., ROSSBERG, H., JÜLICH, W.-D., KRAMER, A. (2006). Comparison of different biological methods for the assessment of ecotoxicological risks. **Int. J. Hyg. Environ. Health**, v. 209. n. 3, p. 275-84, 2006.

FERNÍCOLA, N. A. G. G., BOHRER-MOREL, M. B. C., BAINY, A. C. D. Ecotoxicologia. In: AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. da M. **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. São Carlos: RiMa, 2003. p. 221-243.

FERREIRA, A.L.A; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev Ass Med Brasil**, v. 43. n. 1, p. 61-68, 1997.

FEDERAÇÃO DAS INDÚSTRIAS DO ESTADO DE SANTA CATARINA. **Santa Catarina em Dados: Unidade de Política Econômica e Industrial**. Florianópolis: FIESC, 2010. Disponível em: www2.fiescnet.com.br/web/recursos/VUVSR01UTTBNZz09
Acesso em: 10 mar. 2011.

FISHBASE. *Oreochromis niloticus*. Disponível em: www.fishbase.org. Acesso em: 22 out. 2010.

FLOHR, L., BRENTANO, D. M., CARVALHO-PINTO, C. R. S., MACHADO, V. G., MATIAS, W. G. Classificação de resíduos sólidos industriais com base em testes ecotoxicológicos utilizando *Daphnia magna*: uma alternativa. **Biotemas**, v. 18. n. 2, p. 7 – 18, 2005.

FLOHR, L. **Ensaio toxicológicos com *Daphnia magna* como alternativa para classificação de resíduos sólidos industriais**. 2007. 105p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

FRELLO, C.P. **Avaliação da toxicidade aguda do pesticida Carbofuran utilizando reativos biológicos *Poecilia reticulata* e *Daphnia magna***. 1998. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1998.

FUZINATTO, C., F. **Avaliação da qualidade da água de rios localizados na Ilha de Santa Catarina utilizando parâmetros toxicológicos e o índice de qualidade de água**. 2009. 245p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

GALVÃO FILHO, J.B., NEWMAN, D. Gestão e gerenciamento de risco ambiental I. **Banas Ambiental**, v. 2. n. 12, p. 01-18, 2001.

GARCÍA-MEDINA, S., RAZO-ESTRADA, A.C., GÓMEZ-OLÍVA, L.M., AMAYA-CHÁVEZ, A., MADRIGAL-BUJAJIDAR, E., GALAR-MARTÍNEZ, M. Aluminum-induced oxidative stress in lymphocytes of common carp (*Cyprinus carpio*). **Fish Physiol. Biochem.**, v. 36, p. 875-882, 2010.

GIROTTI, A.W. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. **J. Lipid Res.**, v. 39, 1529 -1542, 1998.

GOPAL, R., NARMADA, S., VIJAYAKUMAR, R., JALEEL, C. A. Chelating efficacy of CaNa_2 EDTA on nickel-induced toxicity in *Cirrhinus mrigala* (Ham.) through its effects on glutathione peroxidase, reduced glutathione and lipid peroxidation. **C.R. Biologies**, v. 332, 685-696, 2009.

GRIMM, V., ASHAUER, R., FORBES, V., HOMMEN, U., PREUSS, T. G., SCHMIDT, A., VAN DEN BRINK, P. J., WOGRAM, J., THORBEEK, P. CREAM: a European project on mechanistic effect models for ecological risk assessment of chemicals. **Environ. Sci. Pollut. Res. Int.**, v. 16. n. 6, p. 614-617, 2009.

GRINEVICIUS, V.M.A.S.; GEREMIAS, R.; LAUS, R.; BETTEGA, K.F.; LARANJEIRAS, M.C.M.; FÁVERE, V.T.; WILHELM FILHO, D.; PEDROSA, R.C. Textile Effluents Induce Biomarkers of Acute Toxicity, Oxidative Stress, and Genotoxicity. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 57, p. 307-314, 2009.

HACON, S.S. Avaliação e gestão do risco ecotoxicológico à saúde humana. In: AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. da M. **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. São Carlos: RiMa, 2003.

HANAZATO, T. Growth analysis of *Daphnia* early juvenile stages as an alternative method to test the chronic effect of chemicals. **Chemosphere**, v. 36, p. 1903- 1909, 1998.

HOPE, B. K. An examination of ecological risk assessment and management practices. **Environ. Int.**, v. 32, p. 983-995, 2006.

HUANG, D., ZHANG, Y., WANG, Y., XIE, Z., JI, W. Assessment of the genotoxicity in toad *Bufo raddei* exposed to petrochemical contaminants in Lanzhou Region, China. **Mutat. Res.**, v. 629, p. 81–88, 2007.

HUTCHINSON, T.H.; JHA, A.N.; MACKAY, J.M.; ELLIOTT, B.M.; DIXON, D.R. Assessment of developmental affects, cytotoxicity and genotoxicity in the marine polychaete (*Platynereis dumerilli*) exposed to disinfected municipal sewage effluent. **Mutat. Res.**, v. 399, p. 97-108, 1998.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa Nacional de Saneamento Básico - 2000**. Rio de Janeiro: IBGE, 2002.

INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION. **ISO 8692**: Water quality – Fresh water algal growth inhibition test whit *Scenedesmus subspicatus* and *Selenastrum capricornutum*. Geneva, 1986.

INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION. **ISO 6341**: Water quality – Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea). Geneva, 1996.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 10706**: Water quality – Determination of long term toxicity of substances to *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea). Geneva, 2000.

INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION. **ISO 11348-3**: Water quality - Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescentbacteria test) – Part 3. Geneva, 2007.

JHA, A.N. Use of aquatic invertebrates in genotoxicological studies. **Mutat. Res.**, v. 399, p. 1-2, 1998.

JHA, A.N, CHEUNG, V.V., FOULKES, M.E., HILL, S.J., DEPLEDGE, M.H. Detection of genotoxins in the marine environment: adoption and evaluation of an integrated approach using the embryolarval stages of the marine mussel, *Mytilus edulis*. **Mutat. Res.**, v. 464, p. 213–228, 2000.

JHA, M. K., KUMAR, V., SINGH, R. J. Review of hydrometallurgical recovery of zinc from industrial wastes. **Resour., Conserv. Recycling**, v. 33, p. 1-22, 2001.

KANG, S.-W., SEO, J., HAN, J., LEE, J.-S., AND JUNG, J. A comparative study of toxicity identification using *Daphnia magna* and *Tigriopus japonicus*: Implications of establishing effluent discharge limits in Korea. **Mar. Pollut. Bull.**, v.63, p. 5-12, 2011.

KAVLOCK, R.J., ANKLEY, G., BLANCATO, J., BREEN, M., CONOLLY, R., DIX, D., HOUCK, K., HUBAL, E., JUDSON, R., RABINOWITZ, J., RICHARD, A., WOODROW SETZER, R., SHAH, I., VILLENEUVE, D., WEBER, E. Computational Toxicology - A State of the Science Mini Review. **Toxicol. Sci.**, v. 103. n. 1, p. 14-27, 2008.

KNIE, J. L. W.; LOPES, E. W. B. **Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações**. Florianópolis: FATMA / GTZ, 2004.

KNOPS, M., ALTENBURGER, R., SEGNER, H. Alterations of physiological energetics, growth and reproduction of *Daphnia magna* under toxicant stress. **Aquat. Toxicol.**, v. 53, p. 79–90, 2001.

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

KOMJAROVA, I., BLUST, R. Multi-metal interactions between Cd, Cu, Ni, Pb and Zn in water flea *Daphnia magna*, a stable isotope experiment. **Aquat. Toxicol.**, v. 90, n. 2, p. 138-144, 2008.

KOSTAMO, A., KUKKONEN, J. V. K. Removal of resin acids and sterols from pulp mill effluents by activated sludge treatment. **Water Res.**, v. 37, p. 2813-2820, 2003.

LAH, B., VIDIC, T., GLASENCNIK, E., CEPELJNIK T., GORJANC G., MARINSEK-LOGAR, R. Genotoxicity evaluation of water soil leachates by Ames test, comet assay, and preliminary Tradescantia micronucleus assay. **Environ. Monit. Assess.**, v. 139, p. 107–118, 2008.

LAMBOLEZ, L., VASSEUR, P., FERARD, J.F., GISBERT, T. The environmental risks of industrial waste disposal: an experimental approach including acute and chronic toxicity studies. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 28, p. 317–328, 1994.

LANDIS, W.G., YU, M-H. **Introduction to environmental toxicology: impacts of chemicals upon ecological systems**. 3^a ed. Boca Raton: Lewis Publishers, 2003.

LAPPALAINEN, J., JUVONEN, R., NURMI, J., KARP, M. Automated color correction method for *Vibrio fischeri* toxicity test. Comparison of standard and kinetic assays. **Chemosphere**, v. 45, p. 635-641, 2001.

LEWIN, B. Controlling chromatin structure - DNA methylation is perpetuated by a maintenance methylase. In: Lewin, B., **Genes VIII**. Upper Saddle River, Pearson Prentice Hall, 2004. p. 680- 681.

LI, D., LU, C. , WANG, L. , HU, W., CAO, Z., SUN, D., XIA, H., MA, X. Developmental mechanisms of arsenite toxicity in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Aquat. Toxicol.**, v. 91, p. 229-237, 2009.

LORA, E.S. **Prevenção e controle da poluição nos setores energético, industrial e de transporte**. Brasília: ANEEL, 2000.

LU, F.C. **Basic Toxicology: Fundamentals, Target Organs, and Risk Assessment**. 3^a ed. Washington: Taylor & Francis, 1996. 358 p.

MACKAY, D., PATERSON, S. Mathematical models of transport and fate. In: SUTER, G. **Ecological Risk Assessment**. Boca Raton: Lewis Publishers, 1993.

MALUF, S.W., ERDTMANN, B. Biomonitorização do dano genético em humanos. In: SILVA, J., ERDTMANN, B., HENRIQUES, J.A.P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Editora Alcance, 2003. p. 181-205.

MATIAS, W. G. **Etude des mecanismes moleculaire d'action de l'acide okadaïque, une toxine marine diarrheique, in vivo et in vitro**. Tese de Doutorado, Université de Bordeaux II, Bordeaux, França, 1996.

MATIAS, W. G., CREPPY, E.E. 5-Methyldeoxycytosine as a biological marker of DNA damage induced by okadaic acid in Vero cells. **Environ. Toxicol. Water Quality**, v. 13, p. 83-88, 1998a.

MATIAS, W. G., CREPPY, E. E. Lipoperoxidação induzida pelo Ácido Ocadáico, uma toxina marinha. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 4, p. 40-44, 1998b.

MATIAS, W. G. **Toxicologia Ambiental: Avaliação e Classificação de Risco Ambiental com Parâmetros Toxicológicos**. Trabalho apresentado no Concurso Público para Professor Adjunto em Toxicologia Ambiental – UFSC, 2002. 46 p.

MATIAS, W.G. **Introdução à Toxicologia ambiental**. Apostila do Curso de Toxicologia Ambiental, ENS-UFSC. Universidade Federal de Santa Catarina, Março de 2005. 36 p.

MEA – MOMENTO ENGENHARIA AMBIENTAL. **Vista aérea do Aterro Sanitário e Industrial de Blumenau – SC**. 2003.

MELEGARI, S. P. **Estudo do mecanismo de ação tóxica da saxitoxina e avaliação de sua adsorção em materiais alternativos para aplicação em sistemas de tratamento de água**. 2010. 205p. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

MIDDAUGH, D.P., BECKHAM, N., FOURNIE, J.W., AND DEARDORFF, T.L. Evaluation of bleached kraft mill process water using Microtox, *Ceriodaphnia dubia*, and *Menidia beryllina* toxicity tests. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 32, p. 367–375, 1997.

MISHRA, A., MOHANTY, B. Acute toxicity impacts of hexavalent chromium on behavior and histopathology of gill, kidney and liver of the freshwater fish, *Channa punctatus* (Bloch). **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v. 26. n. 2, p. 136-141, 2008.

MOZETO, A.A., ZAGATTO, P.A. Introdução de agentes químicos no ambiente. In: ZAGATTO, P.A., BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações**. São Carlos: RiMa, 2006.

NEALSON, HASTINGS, J.W. The luminous bacteria. In: A. BALOWS, H.G. TRÜPER, M. DWORKIN, W. HARDER, K.H. SCHLEIFER. **The Prokaryotes**. 2^a ed. New York: Springer-Verlag, 1991. v.1, p. 625–639.

NELSON, E., SYCURO, L. **Bactérias *Vibrio fischeri* emitindo luminescência** - *Vibrio fischeri Genome Project*. Disponível em: <http://serc.carleton.edu/microbelife/topics/marinesymbiosis/squid-vibrio/> Acesso em: 28 jan. 2009.

NEWMAN, M.C., UNGER, M.A. **Fundamentals of Ecotoxicology**. 2^a ed. Boca Raton: Lewis Publishers, 2000.

NORMANN, C.A.B.M., MOREIRA, J.C.F., CARDOSO, V.V. Micronuclei in red blood cells of armored catfish *Hypostomus plecotomus* exposed to potassium dichromate. **African J. Biotechnol.**, v.7. n.7, p.893-896, 2008.

OAKES, K.D., MCMASTER, M.E., PRYCE, A.C., MUNKITTRICK, K.R., PORTT, C.B., HEWITT, L.M., MACLEAN, D.D., VAN DER KRAAK G.J. Oxidative stress and bioindicators of reproductive function in pulp and paper mill effluent exposed white sucker. **Toxicol. Sci.**, v. 74, p. 51-65, 2003.

OAKES, K.D., VAN DER KRAAK, G.J. Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. **Aquat. Toxicol.**, v. 63, p. 447-463, 2003.

OSMAN, H. A. M., IBRAHIM, T. B., ALI, A. T., DERWA, H. I. M. Field application of humic acid against the effect of cadmium pollution on cultured tilapia *Oreochromis niloticus*. **World Appl. Sci. J.**, v. 6. n. 11, p. 1569-1575, 2009.

OXISCORE. **The Oxiscore Test**. Disponível em: <http://www.toxicwatersolution.com/Free-Radical-Test/Free-Radical-Technical-Information/> Acesso em set. 2011.

PACHECO, M., SANTOS, M. A. Biochemical and genotoxic responses of adult eel (*Anguilla anguilla* L.) to resin acids and pulp mill effluent: laboratory and field experiments. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 42. n. 1, p. 81-93, 1999.

PANDARD, P., DEVILLERS, J., CHARISSOU, A.-M., POULSEN, V., JOURDAIN, M.-J., FÉRARD, J.-F., GRAND, C., BISPO, A. Selecting

a battery of bioassays for ecotoxicological characterization of wastes. **Sci. Tot. Environ.**, v. 363. n. 1-3, p. 114-25, 2006.

PARK, R.A., CLOUGH, J.S., COOMBS WELLMAN, M. AQUATOX: Modeling environmental fate and ecological effects in aquatic ecosystems. **Ecol. Modell.**, v. 213, p. 1–15, 2008.

PAVLAKI, M. D., PEREIRA, R., LOUREIRO, S., SOARES, A. M. V. M. Effects of binary mixtures on the life traits of *Daphnia magna*. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 74. n. 1, p. 99-110, 2011.

PEDROZO, M.F.M., BARBOSA, E.M., CORSEUIL, H.X., SCHNEIDER, M.R., LINHARES, M.M. **Ecotoxicologia e avaliação de risco do petróleo**. Cadernos de referência ambiental. v.12. Salvador: Intertox, 2002.

PIVA, F., CIAPRINI, F., ONORATI, F., BENEDETTI, M., FATTORINI, D., AUSILI, A., REGOLI, F. Assessing sediment hazard through a weight of evidence approach with bioindicator organisms: A practical model to elaborate data from sediment chemistry, bioavailability, biomarkers and ecotoxicological bioassays. **Chemosphere**, v. 83. n.4, p. 475-85, 2011.

PFOHL-LESZKOWICZ A., FUCHS R.P.P., DIRHEIMER G. In vitro enzymatic methylation of DNA substituted by N-2-aminofluorene. **FEBS Lett.**, v. 178, p. 56-60, 1984.

PFOHL-LESZKOWICZ A., DIRHEIMER G. Changes in vivo DNA-(cytosine-5) methyltransferase activity in oncogenetically susceptible rat target tissues induced by N-methyl-N-nitrosourea. **Cancer Res.**, v. 46, p. 1110-1113, 1986.

PICADO, A., MENDONÇA, E., SILVA, L., PAIXÃO, S.M., BRITO, F., CUNHA, M.A., LEITÃO, S., MOURA, I., HERNAN, R. Ecotoxicological assessment of industrial wastewaters in Trancão River Basin (Portugal). **Environ.Toxicol.**, v. 23. n. 4, p. 423-560, 2008.

POGRIBNY, I., BELAND, F.A. DNA hypomethylation in the origin and pathogenesis of human diseases. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 66, p. 2249-2261, 2009.

POPMA, T., MASSER, M. **Tilapia: Life History and Biology.**

Southern Regional Aquaculture Center Publication n. 283. Stoneville: SRAC, 2008. Disponível em:

<https://srac.tamu.edu/index.cfm/event/getFactSheet/whichfactsheet/53/>

Acesso em: 25 mai. 2010

PRETTI, E., CAVALCANTE, D., SIMONATO, J.D., MARTINEZ, C.B.R. Ensaio do cometa e indução de anormalidades eritrocíticas nucleares para detecção de genotoxicidade e mutagenicidade no peixe neotropical *Prochilodus lineatus* expostos à fração solúvel da gasolina. In: CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, VIII, 2007, Caxambu-MG. **Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil.** São Paulo: SEB, 08.11.2007. v.1.

RAND, G. M. **Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate, and risk assessment.** 2^a ed. North Palm Beach: Taylor e Francis, 1995.

REED, M., B. HETLAND. DREAM: a Dose-Related Exposure Assessment Model. Technical Description of Physical-Chemical Fates Components. In: SPE INTERNATIONAL CONFERENCE ON HEALTH, SAFETY AND ENVIRONMENT IN OIL AND GAS EXPLORATION AND PRODUCTION, 2002, Kuala Lumpur. **Society of Petroleum Engineer, Paper n. 73856.** Kuala Lumpur: SPE, 20-22.03.2002. v.1, 23 p.

ROBBENS, J., VAN DER VEM, K., MARAS, M., BLUST, R., DE COEN, W. Ecotoxicological risk assessment using DNA chips and cellular reporters. **Trends Biotechnol.**, v. 25. n. 10, p. 460-466, 2007.

ROBERTSON, K.D. DNA methylation, methyltransferases, and cancer. **Oncogene**, v. 20, p. 3139-3155, 2001.

RODRIGUEZ, M.T.M. Methylation and expression of genes in thyroid differentiated cancer. **Revista Cubana de Endocrinología**, v. 21, n. 3, p. 340-350, 2010.

RODRIGUEZ, P., MARTINEZ-MADRID, M., CID, A. Ecotoxicological assessment of effluents in the Basque country (Northern Spain) by acute and chronic toxicity tests using *Daphnia magna* Straus. **Ecotoxicol.**, v. 15, p. 559-572, 2006.

ROSA, E.V.C., GIURADELLI, T.M., CORRÊA, A.X.R., RÖRIG, L.R., SCHWINGEL, P.R., RESGALLA, C., RADETSKI, C.M. Ecotoxicological evaluation of the short term effects of fresh and stabilized textile sludges before application in forest soil restoration. **Environ. Poll.**, v. 146, p. 463-469, 2007.

SABO-ATTWOOD, T., RAMOS-NINO, M., MOSSMAN, B.T. Environmental carcinogenesis. In: Chang, A., Ganz, P. **Oncology: an evidence-based approach**. New York: Springer Verlag Publishers, 2005. p. 233-243.

SAFFI, J., HENRIQUES, J.A.P. Reparação de DNA em células eucarióticas. In: SILVA, J., ERDTMANN, B., HENRIQUES, J.A.P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Editora Alcance, 2003. p. 268-305.

SALVADORI, D.M.F., RIBEIRO, L.R., FENECH, M. Teste do micronúcleo em células humanas *in vitro*. In: RIBEIRO, L.R., SALVADORI, D.M.F., MARQUES, E.K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: ULBRA, 2003. p. 201-223.

SCHWARZENBACH, R.P., ESCHER, B.I., FENNER, K., HOFSTETTER, T.B, JOHNSON, C.A., VON GUNTEN, U., WEHRLI, B. The Challenge of Micropollutants in Aquatic Systems. **Science**, v. 313, p. 1072 – 1077, 2006.

SECO, J. A study of the leachate toxicity of metal-containing solid wastes using *Daphnia magna*. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 56. n. 3, p. 339-350, 2003.

SILVA, C.R. **Estudo da frequência de hemócitos micronucleados, induzida pelo Acido Oxalico, em mexilhões *Perna perna* (Mollusca: Bivalvia)**. 2000. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental)- Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2000.

SILVA, J., HEUSER, V., ANDRADE, V. Biomonitoramento Ambiental. In: SILVA, J., ERDTMANN, B., HENRIQUES, J.A.P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Editora Alcance, 2003. p.165-180.

SILVA, M. A. R., TESTOLIN, R. C., GODINHO-CASTRO, A. P., CORRÊA, A. X. R., RADETSKI, C. M. Environmental impact of industrial sludge stabilization/solidification products: chemical or ecotoxicological hazard evaluation? **J. Hazard. Mater.** v. 192. n. 3, p. 1108-1113, 2011.

SISINNO, C.L.S. Non-inert industrial solid waste disposal in landfill dumps: evaluation of toxicity and implications for the environment and human health. **Cad. Saúde Pública.**, v. 19. n. 2, p. 369-374, 2003.

SOETAERT, A., VANDENBROUCK, T., VAN DER VEN, K., MARAS, M., VAN REMORTEL, P., BLUST, R., AND DE COEN, W.M. Molecular responses during cadmium-induced stress in *Daphnia magna*: Integration of differential gene expression with higher-level effects. **Aquat. Toxicol.**, v. 83, p. 212–222, 2007.

SPONZA, D.T., AND ISIK, M. Toxicity and intermediates of C.I. Direct Red 28 dye through sequential anaerobic/aerobic treatment. **Process Biochem.**, v. 40, p. 2735–2744, 2005.

STOREY, K.B. Oxidative stress: animal adaptations in nature. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 29, p. 1715- 1733, 1996.

SUJI, G., SIVAKAMI, S. Malondialdehyde, a lipid-derived aldehyde alters the reactivity of Cys34 and the esterase activity of serum albumin. **Toxicol. in Vitro.**, v. 22, p. 618-624, 2008.

SUTER, G. Predictive risk assessments of chemicals. In: SUTER, G. **Ecological Risk Assessment**. Boca Raton: Lewis Publishers, 1993.

TATES, A.D., NEUTEBOOM I., HOFKER, M., DEN ENGELSE L. A micronucleus technique for detecting clastogenic effects of mutagens/carcinogens (DEN, DMN) in hepatocytes of rat liver *in vivo*. **Mutat. Res - Envir. Muta.**, v. 74. n. 1, p. 11-20, 1980.

TERRA, N.R., FEIDEN, I.R., FACHEL, J.M.G., LEMOS, C.T., AND NUNES, E.A., 2008. Ecotoxicological evaluation of sediment and water samples from Sinos River, Rio Grande do Sul, Brazil, using *Daphnia magna* and V79 cells. **Acta Limnol. Brasil.**, v. 20. n. 1, p. 63-72, 2008.

TIGINI, V., GIANSAANTI, P., MANGIAVILLANO, A., PANNOCCHIA, A., AND VARESE, G.C. Evaluation of toxicity,

genotoxicity and environmental risk of simulated textile and tannery wastewaters with a battery of biotests. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v.74. n. 4, p. 866-873, 2011.

TRAVERSO, T., MENINI, S., MAINERI, E.P., PATRIARCA,S., ODETTI, P., COTTALASSO, D., MARINARI, U.M., PRONZATO, M.A. Malondialdehyde, a lipoperoxidation-derived aldehyde, can bring about secondary oxidative damage to proteins. **J. Gerontol. A- Bio.**, v. 59. n. 9, p. 890-895, 2004.

UMBUZEIRO, G.A., ROUBICEK, D.A. Genotoxicidade Ambiental. In: ZAGATTO, P.A., BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações**. São Carlos: RiMa, 2006.

ÜNER, N., ORUC, E. Ö., SEVGILER, Y., SAHIN, N., DURMAZ, H., USTA, D. Effects of diazinon on acetylcholinesterase activity and lipid peroxidation in the brain of *Oreochromis niloticus*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 21, 241–245, 2006.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Biological Testing to control toxic water pollutants: The United States Experience. In: **International Seminar on the use of biological tests for water pollution assessment and control**. Ispra Research Center. Varese, 1986.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **EPA/630/R-95/002F**: Guidelines for Ecological Risk Assessment. Washington, 1998.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **EPA-821-R-02-012**: Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. Office of Water. Washington, 2002a.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **EPA-821-R-02-013**: Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms. 4th ed. Washington, 2002b.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Dunnett Program Version 1.5 Users' Manual**. Environmental Monitoring

Systems Laboratory, Ecological Monitoring Research Division. Cincinnati, 1999.

Disponível em: www.epa.gov/nerleerd/stat2.htm Acesso em: 10 ago. 2010.

UZ-ZAMAN, M., SARKER, S.R., HOSSAIN, S. The effects of industrial effluent discharge on lipid peroxide levels of punti fish (*puntius sophore*) tissue in comparison with those of freshwater fish. **J. Food Lipids.**, v. 15, p. 198-208, 2008.

VANDEGEHUCHTE, M.B., LEMIÈRE, F., JANSSEN, C.R. Quantitative DNA-methylation in *Daphnia magna* and effects of multigeneration Zn exposure. **Comp. Biochem. Physiol. C**, v. 150, p. 343–348, 2009a.

VANDEGEHUCHTE, MICHEL B, KYNDT, T., VANHOLME, B., HAEGEMAN, A., GHEYSEN, G., JANSSEN, COLIN R. Occurrence of DNA methylation in *Daphnia magna* and influence of multigeneration Cd exposure. **Environ. Int.**, v. 35. n. 4, p. 700-706, 2009b.

VILLARROEL, M.L. FERRANDO, M.D.; SANCHO, E. E ANDREU, E. Effects of tetradifon on *Daphnia magna* during chronic exposure and alterations in the toxicity to generations pre-exposed to the pesticide. **Aquat. Toxicol.**, v. 49, p. 39-47, 2000.

VILLEGAS-NAVARRO, A., ROMERO GONZÁLEZ, M.C., ROSAS LÓPEZ, E., DOMÍNGUEZ AGUILAR, R., SACHETIN MARÇAL, W. Evaluation of *Daphnia magna* as an indicator of toxicity and treatment efficacy of textile wastewaters. **Environ. Int.**, v. 25, n. 5, p. 619–624, 1999.

VILLELA, I.V., LAU, A., SILVEIRA, J., PRÁ, D., ROLLA, H.C., SILVEIRA, J. D. Bioensaios para o monitoramento de genotoxicidade ambiental. In: SILVA, J., ERDTMANN, B., HENRIQUES, J.A.P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Editora Alcance, 2003. p. 145-163.

WAALKES, M.P. Cadmium carcinogenesis. **Mutat. Res.**, v. 533, p. 107-120, 2003.

WAHBI, O.M., SHALABY, S.M., EL-DAKAR, A. Y. Effects of pulp and paper industrial effluent on some blood parameters, gonads and flesh proteins in experimentally exposed striped seabream *Lithognathus mormyrus*. **Egypt. J. Aquat. Res.** A, v. 30, p. 25-42, 2004.

WANG, Y., WANG, C., JILIANG ZHANG, J., YIXIN CHEN, Y., ZHENGHONG ZUO, Z. DNA hypomethylation induced by tributyltin, triphenyltin, and a mixture of these in *Sebastiscus marmoratus* liver. **Aquat. Toxicol.**, v. 95, p. 93–98, 2009.

WILSON, A.S., POWER, B.E., MOLLOY, P.L. DNA hypomethylation and human diseases. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1775. n.1, p. 138–162, 2007.

WRIGHT, R.O., SHWARTZ, J., WRIGHT, R.J., BOLLATI, V., TARANTINI, L., PARK, S.K., HU, H., SPARROW, D., VOKONAS, P., BACCARELLI, A. Biomarkers of lead exposure and DNA methylation within retrotransposons. **Environ. Health Persp.**, v. 118. n. 6, p. 790-795, 2010.

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

ZAGATTO, P.A. Avaliação de risco e do potencial de periculosidade ambiental de agentes químicos para o ambiente aquático. In: ZAGATTO, P.A., BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações**. São Carlos: RiMa, 2006b.

ZHANG, J., FU, Y., LI, J., WANG, J., HE, B., XU, S. Effects of subchronic cadmium poisoning on DNA methylation in hens. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v. 27. n. 3, p. 345-349, 2009.

ZHU, Y., WANG, J., BAI, Y., ZHANG, R. Cadmium, chromium, and cooper induce polychromatocyte micronuclei in carp (*Cyprinus carpio* L.). **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v.72, p. 78-86, 2004.

ZURITA, J. L., JOS, A., DEL PESO, A., SALGUERO, M., LÓPEZ-ARTÍGUEZ, M., REPETTO, G. Ecotoxicological assessment of

bromobenzene using a test battery with five model systems. **Food Chem. Toxicol.**, v. 45. n. 4, p. 575-584, 2007.

XAVIER, C., CHAMORRO, S., VIDAL, G. Chronic effects of kraft mill effluents and endocrine active chemicals on *Daphnia magna*. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 75, p. 670–676, 2005.

7. APÊNDICES

A1. BASE DE DADOS PARA O MODELO WTox

As tabelas a seguir apresentam a base de dados consultada para a definição dos valores dos Quadros 2 e 7 com os limites dos parâmetros toxicológicos do Modelo WTox.

1. *Daphnia magna* – Testes de Toxicidade Aguda

Tabela A1 - Base de dados: *Daphnia magna* - estudos sobre toxicidade aguda

Amostra	CE _{50,48h}	Referência
Lodo de estação de tratamento de esgotos	17,8%	Lambolez et al., 1994
Percolado de aterro urbano e industrial (mistura de resíduos)	47 – 53%	Assmuth e Penttila, 1995
Efluente de indústria têxtil	13,89 – 66,66%	Villegas-Navarro et al., 1999
Lixiviado de resíduo de indústria têxtil	70,71%	Flohr, 2007
Efluentes de abatedouros suíncolas.	9,1 %	Barros et al., 2007
Efluentes de indústria de papel e celulose	51%	Picado et al., 2008
Efluente de indústria metal-mecânica	15,38%	Kang et al., 2010

ASSMUTH, T., PENTTILÄ, S. Characteristics, determinants and interpretations of acute lethality in daphnids exposed to complex waste leachates. **Aquat. Toxicol.**, v. 31. n. 2, p. 125-141, 1995.

BARROS, L. S. S.; AMARAL, L. A.; LORENZON, C. S. *Daphnia magna* – bio indicator of pollution from poultry and pig abattoir effluents. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.**, v. 8. n. 3, p. 217-228, 2007.

FLOHR, L. **Ensaio toxicológicos com *Daphnia magna* como alternativa para classificação de resíduos sólidos industriais**. 2007. 105p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

KANG, S.-W., SEO, J., HAN, J., LEE, J.-S., AND JUNG, J. A comparative study of toxicity identification using *Daphnia magna* and *Tigriopus japonicus*: Implications of establishing effluent discharge limits in Korea. **Mar. Pollut. Bull.**, v. 63, p. 5-12, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2010.11.024>
Acesso em: 18 dez. 2010.

LAMBOLEZ, L., VASSEUR, P., FERARD, J.F., GISBERT, T. The environmental risks of industrial waste disposal: an experimental approach including acute and chronic toxicity studies. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 28, p. 317–328, 1994.

PICADO, A., MENDONÇA, E., SILVA, L., PAIXÃO, S.M., BRITO, F., CUNHA, M.A., LEITÃO, S., MOURA, I., HERNAN, R. Ecotoxicological assessment of industrial wastewaters in Trancão River Basin (Portugal). *Environ.Toxicol.*, v. 23. n. 4, p. 423-560, 2008.

VILLEGAS-NAVARRO, A., ROMERO GONZÁLEZ, M.C., ROSAS LÓPEZ, E., DOMÍNGUEZ AGUILAR, R., SACHETIN MARÇAL, W. Evaluation of *Daphnia magna* as an indicator of toxicity and treatment efficacy of textile wastewaters. *Environ. Int.*, v. 25, n. 5, p. 619–624, 1999.

2. *Daphnia magna* – Testes de Toxicidade Crônica

Tabela A2 - Base de dados: *Daphnia magna* – estudos sobre toxicidade crônica

Amostra	Efeito sobre a reprodução	Referência
Metais pesados (concentração não informada)	Redução de 16% no n° de neonatos	Biesinger e Christensen, 1972 <i>apud</i> Newman e Unger, 2000.
Pesticida tetradifon (0,18mg/l)	Redução de 40% no n° de neonatos	Villarrol et al., 2000.
Etanol (0,01ml/L)	Aumento de 272,2% no n° de neonatos.	Zhang e Baer, 2000
Cádmio (8,4µg/L)	Redução de 19% no n° de neonatos	Knops et al., 2001
Percolado de aterro sanitário tratado (concentração 80%)	Aumento de 300% no n° de neonatos	Finkler, 2002
Efluente de indústria metal-mecânica (concentração de 12,5%)	Redução de 93,5% no n° de neonatos	Rodriguez et al., 2006
Algas com alto teor de cobre (3000µg/g)	Redução de 50% no n° de neonatos	De Schampelaere et al., 2007

DE SCHAMPHELAERE K.A.C., DE FORREZ I., DIERCKENS K., SORGELOOS P., JANSSEN, C.R. Chronic toxicity of dietary copper to *Daphnia magna*. *Aquat. Toxicol.*, v. 81, 409–418, 2007.

FINKLER, R. **Avaliação do efeito tóxico de líquido percolado gerado em um aterro sanitário sobre o sistema reprodutivo de *Daphnia magna***. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental)- Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.2002.

KNOPS, M., ALTENBURGER, R., SEGNER, H. Alterations of physiological energetics, growth and reproduction of *Daphnia magna* under toxicant stress. *Aquat. Toxicol.*, v. 53, p. 79–90, 2001.

NEWMAN, M.C., UNGER, M.A. **Fundamentals of Ecotoxicology**. 2ª ed. Boca Raton: Lewis Publishers, 2000.

RODRIGUEZ, P., MARTINEZ-MADRID, M., CID, A. Ecotoxicological assessment of effluents in the Basque country (Northern Spain) by acute and chronic toxicity tests using *Daphnia magna* Straus. **Ecotoxicol.**, v. 15, p. 559–572, 2006.

VILLARROEL, M.L. FERRANDO, M.D.; SANCHO, E. E ANDREU, E. Effects of tetradifon on *Daphnia magna* during chronic exposure and alterations in the toxicity to generations pre-exposed to the pesticide. **Aquat. Toxicol.**, v. 49, p. 39-47, 2000.

ZHANG, L. BAER, K.N. The influence of feeding, photoperiod and selected solvents on the reproductive strategies of the water flea *Daphnia magna*. **Environ. Pollut.**, v. 110, p. 425-430, 2000.

3. *Vibrio fischeri*

Tabela A3 – Base de dados: *Vibrio fischeri* – estudos sobre toxicidade aguda

Amostra	CE _{50, 30 min}	Referência
Dicromato de sódio (7,83mg/L)	50%	Backhaus et al., 1997
Pentaclorofenol (4,41mg/L)	50%	Froehner et al., 2000
Mercúrio (0,15mg/L)	50%	Lappalainen et al., 2000
Sulfato de zinco (2,11mg/L)	61,36%	Jennings et al., 2001
Efluente de indústria de papel e celulose (100%)	13%	Kostamo e Kukkonen, 2003
Cromo VI (1mg/L)	18%	Harmel et al., 2005
Efluente de indústria têxtil (100%)	10,64%	Grinevicius et al., 2009

BACKHAUS, T., FROEHNER, K., ALTENBURGER, R., GRIMME, L. H. Toxicity testing with *Vibrio fischeri*: a comparison between the long term (24 h) and the short term (30 min) bioassay. **Chemosphere**, v. 35. n 12, p. 2925-2938, 1997.

FROEHNER, K., BACKHAUS, T., GRIMME, L.H. Bioassays with *Vibrio fischeri* for the assessment of delayed toxicity. **Chemosphere**, v. 40, p. 821- 828, 2000.

GRINEVICIUS, V.M.A.S.; GEREMIAS, R.; LAUS, R.; BETTEGA, K.F.; LARANJEIRAS, M.C.M.; FÁVERE, V.T.; WILHELM FILHO, D.; PEDROSA, R.C. Textile Effluents Induce Biomarkers of Acute Toxicity, Oxidative Stress, and Genotoxicity. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 57, p. 307–314, 2009.

HARMEI, V. C., SAAR, J.H., PINHEIRO, A. Busca da padronização de um teste de toxicidade crônica com *Vibrio fischeri* para análise da qualidade de águas superficiais. **In:**

Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, 23, 2005, Campo Grande-MS. **Anais do 23º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental**. Rio de Janeiro: ABES, 2005. v.1, p. 1-9.

JENNINGS, V.L.K, RAYNER-BRANDES, M.H., BIRD, D.J. Assessing chemical toxicity with the bioluminescent photobacterium (*Vibrio fischeri*): a comparison of three commercial systems. **Wat. Res.**, v. 35. n. 14, p. 3448–3456, 2001.

KOSTAMO, A., KUKKONEN, J. V. K. Removal of resin acids and sterols from pulp mill effluents by activated sludge treatment. **Wat. Res.**, v. 37, p. 2813-2820, 2003.

LAPPALAINEN, J., JUVONEN, R., NURMI, J., KARP, M. Automated color correction method for *Vibrio fischeri* toxicity test. Comparison of standard and kinetic assays. **Chemosphere**, v. 45, p. 635-641, 2001.

4. Teste do Micronúcleo

Tabela A4 – Base de dados: estudos sobre teste do micronúcleo em peixes

Amostra	Frequência de MN (% em relação ao controle)	Referência
Efluente de indústria de papel e celulose (concentração de 20%, período de exposição não informado)	Aumento de 100%	Das e Nanda, 1986 <i>apud</i> Al-Sabti e Metcalfe, 1995. Al-Sabti, 1994
Cromo hexavalente (50 ng/ml por 7 dias)	Aumento de 115%	<i>apud</i> Al-Sabti e Metcalfe, 1995.
Ciclofosfamida (16 mg/kg por 24h)	Aumento de 246,77%	Matsumoto e Colus, 2000
Efluente de refinaria de petróleo (20% por 3 dias)	Aumento de 78,5%	Çavas e Ergene-Gözükara, 2005
Mistura química de óleo (0,5 ppm) + fenóis alquilados (0,1 ppm) por 21 dias	Aumento de 150%	Bolognesi et al., 2006
Fração solúvel de gasolina (5% por 96h)	Aumento de 191,5%	Pretti et al., 2007
Dicromato de potássio (12mg/L por 15 dias)	Aumento de 550%	Normann et al., 2008

AL-SABTI, K., METCALFE, C.D Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutat. Res.**, v.343, p. 121- 135, 1995.

BOLOGNESI C.; PERRONE, E.; ROGGIERI, P.; M. PAMPANIN D. M.; SCIUTTO, A. Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish exposed to xenobiotics under controlled conditions. **Aquat. Toxicol.**, v.78, p. 93– 98, 2006.

ÇAVAS, T., ERGENE-GÖZÜKARA, S. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. **Aquat. Toxicol.**, v. 74. n. 3, p. 264-71, 2005.

MATSUMOTO, F.E., CÓLUS, I.M.S. Micronucleus frequencies in *Astyanax bimaculatus* (Characidae) treated with cyclophosphamide or vinblastine sulfate. **Genet. Mol. Biol.**, v. 23. n. 2, p. 489-492, 2000.

NORMANN, C.A.B.M., MOREIRA, J.C.F., CARDOSO, V.V. Micronuclei in red blood cells of armored catfish *Hypostomus plecotomus* exposed to potassium dichromate. **African J. Biotechnol.**, v.7. n.7, p.893-896, 2008.

PRETTI, E., CAVALCANTE, D., SIMONATO, J.D., MARTINEZ, C.B.R. Ensaio do cometa e indução de anormalidades eritrocíticas nucleares para detecção de genotoxicidade e mutagenicidade no peixe neotropical *Prochilodus lineatus* expostos à fração solúvel da gasolina. In: CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, VIII, 2007, Caxambu-MG. **Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil**. São Paulo: SEB, 08.11.2007. v.1.

5. Teste de Lipoperoxidação

Tabela A5 – Base de dados: estudos sobre lipoperoxidação.

Amostra	Dosagem da produção de MDA (%)	Referência
Ácido ocadáico (células Vero expostas à 0,75 ng/mL por 24h)	Aumento de 74 %	Matias e Creppy, 1998b
Zinco (peixes expostos à 0,5 mM por 20h)	Aumento de 60,5%	Gabryelak et al., 2002
Cádmio (peixes expostos à 0,35 mg/L por 60 dias)	Aumento de 56,92%	Almeida et al., 2002
Efluente de refinaria de petróleo (peixes coletados em área que recebe estes efluentes)	Aumento de 115%	Avci et al., 2005
Cromo hexavalente (amostras de plasma de trabalhadores de uma indústria de chapas cromadas)	Aumento de 76,23%	Kalahasthi et al., 2006
Fibras de amianto (células MeT5A expostas à 10 µg/cm ² por 24h)	Aumento de 155,55%	Cardinali et al., 2006
Cobre (cegonhas que vivem em área de manufatura de cobre)	Aumento de 118,02%	Kaminski et al., 2009
Alumínio (peixes expostos à 120mg/L por 48h)	Aumento de 529%	Garcia-Medina et al., 2010

ALMEIDA, E.A., BAINY, A.C.D., LOUREIRO, A.P.M., MARTINEZ, G.R., MIYAMOTO,S., ONUKI, J., BARBOSA, L.F., GARCIA, C.C.M., PRADO, F.M., RONSEIN, G.E., SIGOLO, C.A., BROCHINI,C.B., MARTINS, A.M.G., MEDEIROS, M.H.G., DI MASCIO, P. Oxidative stress in *Perna perna* and other bivalves as indicators of environmental

stress in the Brazilian marine environment: Antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage. **Comp. Biochem. Physiol. A**, v. 146, p. 588-600, 2007.

AVCI, A., KAÇMAZ, M., DURAK, I. Peroxidation in muscle and liver tissues from fish in a contaminated river due to a petroleum refinery industry. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 60, p. 101-105, 2005.

CARDINALI, G., KOVACS, D., MARESCA, V. FLORI, E., DELL'ANNA, M.L., CAMPOPIANO, A., CASCIARDI, S. SPAGNOLI, G., TORRISI, M.R., PICARDO, M. Differential in vitro cellular response induced by exposure to synthetic vitreous fibers (SVFs) and asbestos crocidolite fibers. **Exp. Mol. Pathol.**, v. 81, p. 31-41, 2006.

GABRYELAK, T., AKAHORI, A., PRZYBYLSKA, M., JÓZWIAK, Z., BRICHON, G. Carp erythrocyte lipids as a potential target for the toxic action of zinc ions. **Toxicol. Lett.**, v. 132. n. 1, p. 57-64, 2002.

GARCÍA-MEDINA, S., RAZO-ESTRADA, A.C., GÓMEZ-OLÍVA, L.M., AMAYA-CHÁVEZ, A., MADRIGAL-BUJUIDAR, E., GALAR-MARTÍNEZ, M. Aluminum-induced oxidative stress in lymphocytes of common carp (*Cyprinus carpio*). **Fish Physiol. Biochem.**, v. 36, p. 875-882, 2010.

KALAHASTHI, R.B., RAO, R.H.R., MURTHY, R.B.K. M., KUMAR, K. Effect of chromium(VI) on the status of plasma lipid peroxidation and erythrocyte antioxidant enzymes in chromium plating workers. **Chem.-Biol. Interact.**, v. 164, p. 192-199, 2006.

KAMINSKI, P., KURHALYUK, N., JERZAK, L., KASPRZAK, M., TKACHENKO, H., KLAWE, J.J., SZADY, M., KOIM, B., WISNIEWSKA, E. Ecophysiological determinations of antioxidant enzymes and lipoperoxidation in the blood of White Stork (*Ciconia ciconia*) from Poland. **Environ. Res.**, v. 109. n. 1., p. 29-39, 2009.

MATIAS, W. G., CREPPY, E. E. Lipoperoxidação induzida pelo Ácido Ocadáico, uma toxina marinha. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 4, p. 40 - 44, 1998b.

6. Teste de Metilação do DNA

Tabela A6 – Base de dados: estudos sobre metilação biológica do DNA.

Amostra	Dosagem da m ³ dC	Referência
Arsênico (células A549 expostas à 2µM por 24h)	Aumento de 328%	Mass e Wang, 1997
Ácido Ocadaico (células Vero expostas à 7,5 ng/mL por 24h)	Aumento de 103,15%	Matias e Creppy, 1998a.
Cádmio (células Caco-2 expostas à 5µg/mL por 24 h)	Aumento de 55,55%	Traore et al., 2000
Contaminantes de petroquímica (sapos coletados em áreas atingidas pelo contaminante, que possui 0,05 mg/L de óleo)	Aumento de 95%	Huang et al., 2007
17-β oestradiol (peixes expostos à 100 ng/L por 30 dias)	Aumento de 31%	Aniagu et al., 2008
Tributyltin – TBT (peixes expostos à 100 ng/L por 48 dias)	Queda de 60%	Wang et al., 2009
Cádmio (galinhas expostas à 140 mg/kg CdCl ₂ por 60 dias)	Aumento de 81,48 %	Zhang et al., 2009

ANIAGU, S.O., WILLIAMS, T.D., ALLEN, Y., KATSIADAKI, I., CHIPMAN, J.K. Global genomic methylation levels in the liver and gonads of the three-spine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) after exposure to hexabromocyclododecane and 17-β oestradiol. **Environ. Int.**, v. 34, p. 310–317, 2008.

HUANG, D., ZHANG, Y., WANG, Y., XIE, Z., JI, W. Assessment of the genotoxicity in toad *Bufo raddei* exposed to petrochemical contaminants in Lanzhou Region, China. **Mutat. Res.**, v. 629, p. 81–88, 2007.

MASS, M. J., WANG, L. Arsenic alters cytosine methylation patterns of the promoter of the tumor suppressor gene p53 in human lung cells: a model for a mechanism of carcinogenesis. **Mutat. Res.**, v.386. n.3, p. 263-77, 1997.

MATIAS, W. G., CREPPY, E.E. 5-Methyldeoxycytosine as a biological marker of DNA damage induced by okadaic acid in Vero cells. **Environ. Toxicol. Water Quality**, v. 13, p. 83-88, 1998a.

TRAORE, A., RUIZ, S., BAUDRIMONT, I., SANNI, A., DANO, S. D., GUARIGUES, P. H., NARBONNE, J.F., CREPPY, E.E. Combined effects of okadaic acid and cadmium on lipid peroxidation and DNA bases modifications (m³dC and 8-(OH) -dG) in Caco-2 cells. **Mol. Toxicol.**, v. 74, p.79-84, 2000.

ZHANG, J., FU, Y., LI, J., WANG, J., HE, B., XU, S. Effects of subchronic cadmium poisoning on DNA methylation in hens. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v. 27. n. 3, p. 345-349, 2009.

WANG, Y., WANG, C., JILIANG ZHANG, J., YIXIN CHEN, Y., ZHENGHONG ZUO, Z. DNA hypomethylation induced by tributyltin, triphenyltin, and a mixture of these in *Sebastiscus marmoratus* liver. **Aquat. Toxicol.**, v. 95, p. 93-98, 2009.

7. Teste do Cometa

Tabela A7 – Base de dados: estudos sobre o teste do Cometa.

Amostra	Danos provocados (%) em relação ao controle	Referência
Peróxido de hidrogênio (células de sangue de peixe expostas à 200µM por 1h)	Aumento de 317%	Mitchelmore e Chipman, 1998
Cloreto de cromo (embriões de camarões expostos à 1000µg/L por 14-20 dias até o rompimento do ovo)	Aumento de 945,45%	Lee et al., 2000
Dicromato de potássio (ratos expostos à 9,5mg/kg por 48h)	Aumento de 265,4%	Devi et al., 2001
Fração solúvel de gasolina (peixes expostos à 5%, por 96h)	Aumento de 73,7%	Pretti et al., 2007

DEVI, K. D., ROZATI, R., BANU, B. S., JAMIL, K., GROVER, P. *In vivo* genotoxic effect of potassium dichromate in mice leukocytes using comet assay. **Food Chem. Toxicol.**, v. 39, n. 8, p. 859-65, 2001.

LEE, R., KIM, G. B., MARUYA, K. A., STEINERT, S. A. DNA strand breaks (comet assay) and embryo development effects in grass shrimp (*Palaemonetes pugio*) embryos after exposure to genotoxicants. **Mar. Environ. Res.**, v. 50, p. 553-557, 2000.

MITCHELMORE, C. L., CHIPMAN, J. K. Detection of DNA strand breaks in brown trout (*Salmo trutta*) hepatocytes and blood cells using the single cell gel electrophoresis (comet) assay. **DNA Repair**, v. 41, p. 161-182, 1998.

PRETTI, E., CAVALCANTE, D., SIMONATO, J.D., MARTINEZ, C.B.R. Ensaio do cometa e indução de anormalidades eritrocíticas nucleares para detecção de genotoxicidade e mutagenicidade no peixe neotropical *Prochilodus lineatus* expostos à fração solúvel da gasolina. In: CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, VIII, 2007, Caxambu-MG. **Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil**. São Paulo: SEB, 08.11.2007. v.1.

A2. RESULTADOS - TESTES DE TOXICIDADE AGUDA

As tabelas a seguir apresentam o número de organismos que ficaram imóveis em períodos de exposição de 24 e 48 horas. As concentrações variaram para cada amostra testada, para que assim fosse possível determinar a CE_{50} - concentração letal que afeta 50% dos organismos *Daphnia magna*.

Amostra TX1 - Lodo de ETE de Indústria Têxtil, Classe II A.
pH (após lixiviação): 6,83. O_2 dissolvido (após lixiviação): 2,9 mg/L
CE 50 48h: 70,71%

Tabela A8 – Organismos imóveis após exposição à amostra TX1.

Concentração (%)	Organismos imóveis			
	24h		48h	
	A	B	A	B
Controle	0	0	0	0
100	2	3	5	7
50	2	1	5	3
25	0	0	2	3
12,5	0	0	2	2

Amostra TX2 – Lodo de ETE de Indústria Têxtil, Classe II A.
pH (após lixiviação): 7,75. O_2 dissolvido (após lixiviação): 5,8 mg/L
CE 50 48h: 100%

Tabela A9 – Organismos imóveis após exposição à amostra TX2.

Concentração (%)	Organismos imóveis			
	24h		48h	
	A	B	A	B
Controle	0	0	0	0
100	0	0	0	0
50	0	0	0	0
25	0	0	0	0
12,5	0	0	0	0

Amostra TX3 – Lodo de ETE de Indústria Têxtil, Classe II A.

pH (após lixiviação): 7,71.

O₂ dissolvido (após lixiviação): 4,0 mg/L

CE 50 48h: 70,71%

Tabela A10 – Organismos imóveis após exposição à amostra TX3.

Concentração (%)	Organismos imóveis			
	24h		48h	
	A	B	A	B
Controle	0	0	0	0
100	10	10	10	10
50	10	10	10	10
25	10	10	10	10
12,5	4	2	7	10
6,25	0	0	0	0

Amostra TX4 – Lodo de ETE de Indústria Têxtil, Classe II A.

pH (após lixiviação): 6,9

O₂ dissolvido (após lixiviação): 3,2 mg/L

CE 50 48h: 48,29 %

Tabela A11 – Organismos imóveis após exposição à amostra TX4.

Concentração (%)	Organismos imóveis			
	24h		48h	
	A	B	A	B
Controle	0	0	0	0
100	9	10	10	10
50	7	2	7	2
25	0	0	0	2
12,5	0	0	0	0

Amostra MM1 – Lodo de ETE de Indústria Metal-Mecânica, Classe II A

pH (após lixiviação): 8,89.

O₂ dissolvido (após lixiviação): 4,3 mg/L

CE 50 48h: 84,86 %

Tabela A12 – Organismos imóveis após exposição à amostra MM1.

Concentração (%)	Organismos imóveis			
	24h		48h	
	A	B	A	B
Controle	0	0	0	0
100	7	6	7	6
50	0	0	0	0
25	0	0	0	0
12,5	0	0	1	0

Amostra MM2 – Lodo de ETE de Indústria Metal-Mecânica, Classe II A.

pH (após lixiviação): 9,47

O₂ dissolvido (após lixiviação): 4,7 mg/L

CE 50 48h: 70,71 %

Tabela A13 – Organismos imóveis após exposição à amostra MM2.

Concentração (%)	Organismos imóveis			
	24h		48h	
	A	B	A	B
Controle	0	0	0	0
100	10	10	10	10
50	0	0	0	0
25	0	0	0	0
12,5	0	0	0	0

Amostra MM3 – Lodo de ETE de Indústria Metal-Mecânica, Classe II A.
 pH (após lixiviação): 6,09.
 O₂ dissolvido (após lixiviação): 5,8 mg/L
 CE 50 48h: 2,21 %

Tabela A14 – Organismos imóveis após exposição à amostra MM3.

Concentração (%)	Organismos imóveis			
	24h		48h	
	A	B	A	B
Controle	0	0	0	0
6,25	7	4	10	10
3,12	5	3	10	10
1,56	0	0	0	0
0,78	0	0	5	5

Amostra PP1 – Lodo de ETE de Indústria de Papel e Celulose, Classe II A.
 pH (após lixiviação): 6,72.
 O₂ dissolvido (após lixiviação): 4,1 mg/L
 CE 50 48h: 100 %

Tabela A15 – Organismos imóveis após exposição à amostra PP1.

Concentração (%)	Organismos imóveis			
	24h		48h	
	A	B	A	B
Controle	0	0	0	0
100	0	0	0	0
50	0	0	0	0
25	0	0	0	0
12,5	0	1	4	2

Amostra PP2 – Lodo de ETE de Indústria de Papel e Celulose, Classe II A.

pH (após lixiviação): 8,17

O₂ dissolvido (após lixiviação): 5,6mg/L

CE 50 48h: 100 %

Tabela A16 – Organismos imóveis após exposição à amostra PP2.

Concentração (%)	Organismos imóveis			
	24h		48h	
	A	B	A	B
Controle	0	0	0	0
100	0	0	0	0
50	0	0	0	0
25	0	0	0	0
12,5	0	0	0	0

Amostra PP3 – Lodo de ETE de Indústria de Papel e Celulose, Classe II A.

pH (após lixiviação): 6,3

O₂ dissolvido (após lixiviação): 3,4 mg/L

CE 50 48h: 51,76 %

Tabela A17 – Organismos imóveis após exposição à amostra PP3.

Concentração (%)	Organismos imóveis			
	24h		48h	
	A	B	A	B
Controle	0	0	0	0
100	10	10	10	10
50	1	0	1	0
25	0	3	0	4
12,5	0	0	0	0
6,25	1	0	4	0
3,125	0	0	0	0

A3. TESTE DE TOXICIDADE AGUDA COM *Vibrio fischeri* – PROCEDIMENTOS UTILIZADOS

Os procedimentos são baseados na ISO 11348-3, e o passo a passo (Etapa 1 até 17) demonstrado nas figuras a seguir, é fornecido pelo software Microsoft Omni 4.0. A diluição inicial da amostra é de 80%.

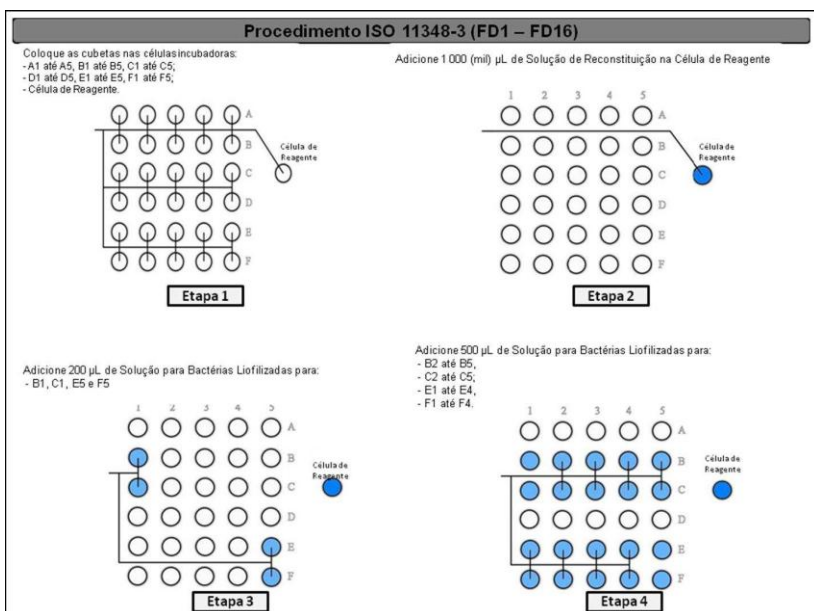


Figura A1: Etapas 1 à 4 do teste de toxicidade com *Vibrio fischeri*.

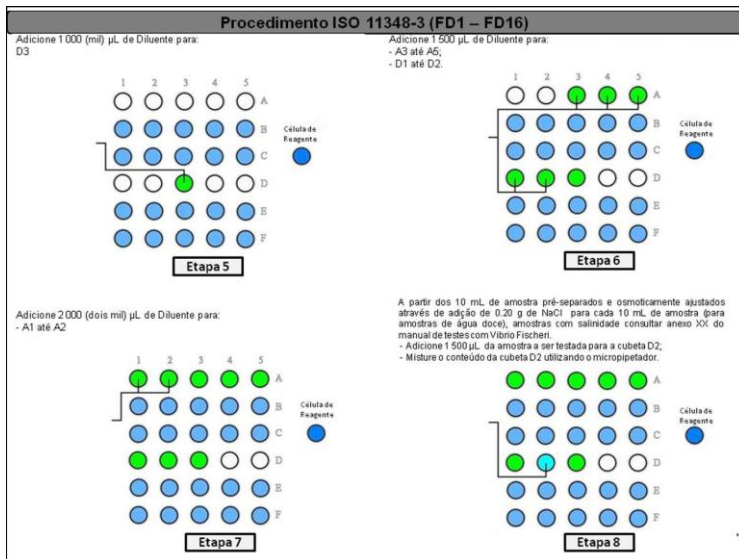


Figura A2: Etapas 5 à 8 do teste de toxicidade com *Vibrio fischeri*.

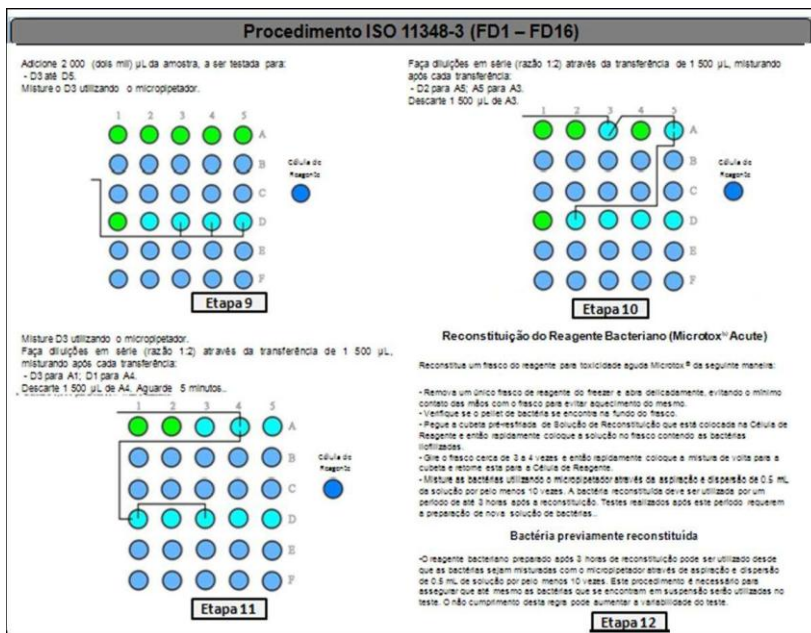


Figura A3: Etapas 9 à 12 do teste de toxicidade com *Vibrio fischeri*.

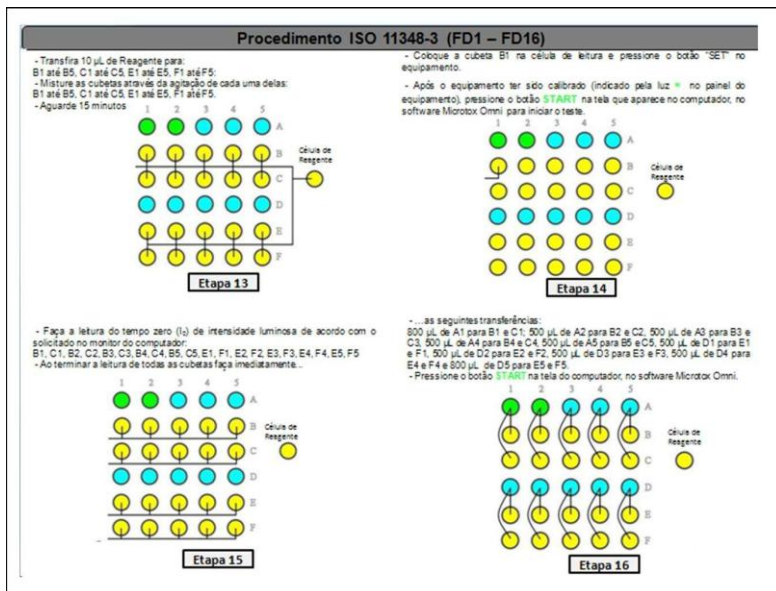


Figura A4: Etapas 13 à 16 do teste de toxicidade com *Vibrio fischeri*.

Procedimento ISO 11348-3 (FD1 – FD16)

- Ao pressionar o botão STAR aparece a contagem regressiva de 15 minutos no monitor do computador. Quando o tempo se esgotar realiza e leitura da intensidade luminosa de acordo com o solicitado no monitor do computador
B1, C1, B2, C2, B3, C3, B4, C4, B5, C5, E1, F1, E2, F2, E3, F3, E4, F4, E5, F5.

Etapa 17

FD	Diluição da amostra	Diluição amostra no teste	% Concent. Amostra no teste	Cubeta
1	0	1:125	80,00	E5, F5
2	0	1:2	50,00	E4, F4
3	1:1,5	1:3	33,33	E3, F3
4	1:2	1:4	25,00	E2, F2
6	1:3	1:6	16,67	E1, F1
8	1:4	1:8	12,50	B5, C5
12	1:6	1:12	8,33	B4, C4
16	1:8	1:16	6,25	B3, C3
Controle				B2, C2
Controle 80%				B1, C1

Material necessário para a realização deste teste:

- 30 cubetas de borossilicato
- Becker de vidro para descarte
- Micropipetadores e pipetas
- 1 ml de Solução de Reconstituição
- 6,8 mL de Solução para Bactérias Liofilizadas
- 1 frasco de bactérias liofilizadas (Microtox Acute Reagent)
- 15,5 mL de Diluente
- 200 µL de bactéria reconstituída
- 10 mL de amostra a ser testada

Observações:

Fig 1. Tela do Software Microtox Omni (referente a Etapa 14)

Fig 2. Tela do Software Microtox Omni (referente a Etapa 15)

Figura A5: Etapa 17 do teste de toxicidade com *Vibrio fischeri*.

As tabelas a seguir apresentam o resumo dos dados de reprodução obtidos em cada ensaio de toxicidade crônica com o organismo *Daphnia magna*, em um período de 21 dias de teste.

Amostra TX1 - Lodo de ETE de Indústria Têxtil, Classe II A.
Lote utilizado: 149 - Sensibilidade: 0,99 mg/L

Tabela A18 – Dados gerais do teste de toxicidade crônica – amostra TX1.

Concentração (%)	Número de organismos que reproduziram	Total de neonatos	Média de neonatos por postura por organismo	Desvio padrão da média
Controle	10	898	21,9	4,18
50	8	1120	26,24	4,30
25	7	872	26,70	5,90
12,5	4	470	27,91	3,04
6,25	6	682	24,6	4,33

Amostra TX2 - Lodo de ETE de Indústria Têxtil, Classe II A.
Lote utilizado: 149 - Sensibilidade: 0,99 mg/L

Tabela A19 – Dados gerais do teste de toxicidade crônica – amostra TX2.

Concentração (%)	Número de organismos que reproduziram	Total de neonatos	Média de neonatos por postura por organismo	Desvio padrão da média
Controle	10	898	21,9	4,18
25	5	821	38,98	3,67
12,5	9	1393	33,56	5,45
6,25	6	963	30,09	11,78
3,125	8	802	19,14	5,25

Amostra TX3 – Lodo de ETE de Indústria Têxtil, Classe II A.
Lote utilizado: 162 - Sensibilidade: 0,92 mg/L

Tabela A20 – Dados gerais do teste de toxicidade crônica – amostra TX3.

Concentração (%)	Número de organismos que reproduziram	Total de neonatos	Média de neonatos por postura por organismo	Desvio padrão da média
Controle	10	1082	19,11	2,54
6,25	6	1165	38,14	5,18
3,125	9	1454	31,16	7,11
1,56	8	1289	30,91	3,71
0,78	9	1172	25,32	4,51

Amostra TX4 – Lodo de ETE de Indústria Têxtil, Classe II A.
Lote utilizado: 166 - Sensibilidade: 0,95 mg/L

Tabela A21 – Dados gerais do teste de toxicidade crônica – amostra TX4.

Concentração (%)	Número de organismos que reproduziram	Total de neonatos	Média de neonatos por postura por organismo	Desvio padrão da média
Controle	10	1166	20,66	3,03
12,5	5	291	16,8	3,27
6,25	9	1041	23,67	7,84
3,125	7	791	22,72	7,22
1,56	5	543	23,64	3,92

Amostra MM1 – Lodo de ETE de Indústria Metal-Mecânica, Classe II A.
Lote utilizado: 153 - Sensibilidade: 0,98 mg/L

Tabela A22 – Dados gerais do teste de toxicidade crônica – amostra MM1.

Concentração (%)	Número de organismos que reproduziram	Total de neonatos	Média de neonatos por postura por organismo	Desvio padrão da média
Controle	10	730	18,98	2,57
1,56	6	827	23,77	4,34
1,04	9	1189	24,53	3,96
0,78	8	850	20,09	4,68
0,52	6	714	22,45	3,29

Amostra MM2 – Lodo de ETE de Indústria Metal-Mecânica, Classe II A.
Lote utilizado: 168 - Sensibilidade: 0,82 mg/L

Tabela A23 – Dados gerais do teste de toxicidade crônica – amostra MM2.

Concentração (%)	Número de organismos que reproduziram	Total de neonatos	Média de neonatos por postura por organismo	Desvio padrão da média
Controle	10	795	15,34	3,30
50	3	13	2,66	2,08
25	9	724	27,49	9,31
12,5	10	840	20,11	5,19
6,25	10	746	16,37	3,65

Amostra MM3 – Lodo de ETE de Indústria Metal-Mecânica, Classe II A.
Lote utilizado: 153 - Sensibilidade: 0,98 mg/L

Tabela A24 – Dados gerais do teste de toxicidade crônica – amostra MM3.

Concentração (%)	Número de organismos que reproduziram	Total de neonatos	Média de neonatos por postura por organismo	Desvio padrão da média
Controle	10	799	16,23	2,57
1,56	7	1018	26,21	2,77
1,04	9	1265	27,56	1,99
0,78	8	918	22,18	2,98
0,52	7	787	20,41	3,41

Amostra PP1 – Lodo de ETE de Indústria de Papel e Celulose, Classe II A.
Lote utilizado: 162 - Sensibilidade: 0,92 mg/L

Tabela A25 – Dados gerais do teste de toxicidade crônica – amostra PP1.

Concentração (%)	Número de organismos que reproduziram	Total de neonatos	Média de neonatos por postura por organismo	Desvio padrão da média
Controle	10	1091	19,57	2,69
100	6	441	24,34	9,10
50	8	1688	29,32	6,57
25	10	1528	28,95	6,15
12,5	9	1446	33,27	5,15

Amostra PP2 – Lodo de ETE de Indústria de Papel e Celulose, Classe II A.
Lote utilizado: 166 - Sensibilidade: 0,95 mg/L

Tabela A26 – Dados gerais do teste de toxicidade crônica – amostra PP2.

Concentração (%)	Número de organismos que reproduziram	Total de neonatos	Média de neonatos por postura por organismo	Desvio padrão da média
Controle	10	1165	19,49	3,89
100	3	38	5,78	4,67
50	10	1049	24,22	4,76
25	9	1071	24,84	3,03
12,5	10	1272	26,43	3,22

Amostra PP3 – Lodo de ETE de Indústria de Papel e Celulose, Classe II A.
Lote utilizado: 168 - Sensibilidade: 0,82 mg/L

Tabela A27 – Dados gerais do teste de toxicidade crônica – amostra PP3.

Concentração (%)	Número de organismos que reproduziram	Total de neonatos	Média de neonatos por postura por organismo	Desvio padrão da média
Controle	10	460	9,20	1,74
50	2	3	1,50	0,71
25	8	80	6,81	3,50
12,5	10	193	8,13	2,60
6,25	10	187	5,49	1,92

A5. RESULTADOS - TESTE DE LIPOPEROXIDAÇÃO

1. Curva de calibração para quantificação do malondialdeído (MDA)

Para a realização da curva de calibração do malondialdeído utilizou-se um método analítico baseado em Kouadio et al. (2007). As análises foram realizadas por HPLC, com um padrão de MDA. Foram realizadas 7 diluições do padrão, mas apenas 3 diluições foram utilizadas para a construção da curva de calibração do MDA. Os valores das áreas dos picos de injeção são apresentados na Tabela A28. Com o cálculo das áreas, foi possível construir a curva de calibração que foi empregada para a quantificação do MDA no ensaio de lipoperoxidação (Figura A6). A Figura A7 apresenta o cromatograma de um ponto da curva de calibração do padrão do MDA.

Tabela A28 - Valores da área dos picos observados nas concentrações padrão de MDA empregadas para a construção da curva de calibração.

[MDA] (nM)	Área (μ V.S)
7,5	35235
15	60858
30	133135

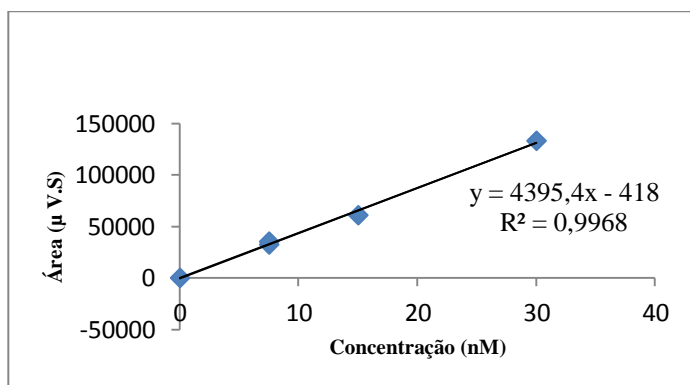


Figura A6 – Curva de calibração do método empregado para quantificação do MDA no ensaio de lipoperoxidação.

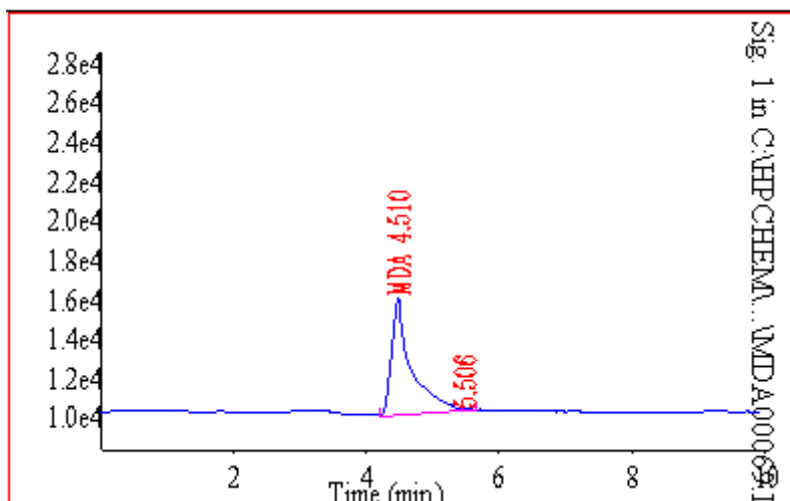


Figura A7 – Cromatograma do padrão do MDA (30nM – t_R : 4,51 min).

KOUADIO, J.H., DANOB, S.D., MOUKHA, S., MOBIO, T.A., CREPPY, E.E. Effects of combinations of Fusarium mycotoxins on the inhibition of macromolecular synthesis, malondialdehyde levels, DNA methylation and fragmentation, and viability in Caco-2 cells. *Toxicol.*, v. 49, p. 306 – 317, 2007.

2. Curva de calibração para a quantificação de proteínas

Para a realização da quantificação de proteínas foi utilizado o método analítico de Bradford, 1976. As análises foram realizadas por espectrometria de ultravioleta (UV). Foram definidos cinco pontos para a construção da curva de calibração de dosagem da proteína em eritrócitos de *Oreochromis niloticus*. Albumina bovina (BSA) foi empregada como padrão. Os valores das absorvâncias no comprimento de onda de 595nm estão apresentados na Tabela A29. A partir dos valores de absorvância foi possível construir a curva de calibração (Figura A8) que foi empregada para a quantificação da proteína das amostras no ensaio da lipoperoxidação.

Tabela A29 – Valores de absorvância observados nas concentrações de BSA empregadas para a construção da curva de calibração.

[BSA] $\mu\text{g/ mL}$	DO 595 nm
0,31	0,033
0,63	0,0593
1,25	0,1409
2,50	0,2103
5,00	0,3297

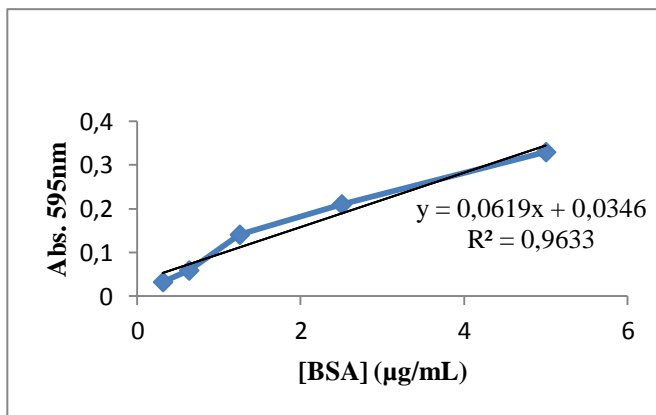


Figura A8 – Curva de calibração do método empregado para quantificação da proteína BSA no ensaio de lipoperoxidação.

3. Resultados da quantificação de proteínas e de MDA.

Tabela A30 – Resultados da quantificação de proteínas e de MDA

Amostras	PROTEÍNAS leitura 595nm (µg/mL)	Correção da diluição (µg/mL)		MDA (nM) leitura HPLC	MDA (nM/mg de proteína)	Média MDA (nM/mg de proteína)	DP
c+a	69,77	3488,65	802,39	101,88	126,97	168,09	58,15
c+b	84,87	4243,65	976,04	204,19	209,20		
c-a	245,13	12256,65	2819,03	92,85	32,94	27,05	8,32
c-b	242,80	12139,85	2792,17	59,10	21,17		
1a	46,66	2332,90	536,57	60,57	112,88	132,36	27,55
1b	43,59	2179,50	501,29	76,12	151,84		
2a	82,20	4110,10	945,32	140,23	148,34	140,28	11,40
2b	88,21	4410,40	1014,39	134,13	132,23		
3a	91,76	4588,20	1055,29	126,33	119,71	133,50	19,49
3b	99,16	4958,20	1140,39	167,96	147,28		
4a	95,64	4781,95	1099,85	140,22	127,49	125,34	3,04
4b	101,20	5059,85	1163,77	143,36	123,19		
5a	227,46	11372,84	2615,75	157,46	60,20	55,78	6,25
5b	258,63	12931,35	2974,21	152,74	51,36		
6a	271,88	13594,15	3126,65	151,27	48,38	48,01	0,52
6b	276,65	13832,35	3181,44	151,58	47,64		
7a	249,48	12473,85	2868,99	111,08	38,72	40,17	2,06
7b	249,38	12469,15	2867,90	119,40	41,63		
8a	244,31	12215,70	2809,61	117,29	41,75	44,93	4,50
8b	249,35	12467,40	2867,50	137,96	48,11		
9a	252,22	12611,20	2900,58	577,06	198,95	190,02	12,62
9b	249,65	12482,70	2871,02	519,95	181,10		
10a	239,90	11994,80	2758,80	82,63	29,95	28,56	1,97
10b	255,68	12783,90	2940,30	79,88	27,17		

Para realizar a correção da diluição da dosagem de proteínas aplica-se a seguinte fórmula:

Quantidade de proteínas * 50 * 0,23

A6. RESULTADOS - TESTE DE METILAÇÃO BIOLÓGICA DO DNA

1. Curva de calibração para quantificação da 5-metilcitosina (m^5dC)

Para a realização da curva de calibração da 5-metilcitosina utilizou-se um método analítico baseado em Kouadio et al., (2007). As análises foram realizadas por HPLC-UV. Foram definidos 7 pontos para a construção da curva de calibração. Foi empregada uma mistura das bases do DNA citosina (dC) e a base metilada 5-metilcitosina (m^5dC). Os valores das áreas dos picos de injeção são apresentados na Tabela A31. Com o cálculo das áreas, foi possível construir a curva de calibração que foi empregada para a quantificação da citosina e da 5-metilcitosina no ensaio da metilação do DNA (Figura A9).

Tabela A31 - Valores da área dos picos observados nas bases citosina (dC) e 5-metilcitosina (m^5dC) empregadas para a construção da curva de calibração.

Base	Área dos picos							
	Tempo de retenção (min)	Pontos da curva de calibração ($\mu\text{g/mL}$)						
		1,56	3,125	6,25	12,5	25	50	100
dC	3,8	9861,6	17368,8	37133,9	76117,4	142963,3	257997,9	571069,6
m^5dC	4,8	4260,9	7724,1	17148,7	35153,8	61655,3	113522,8	229742,5

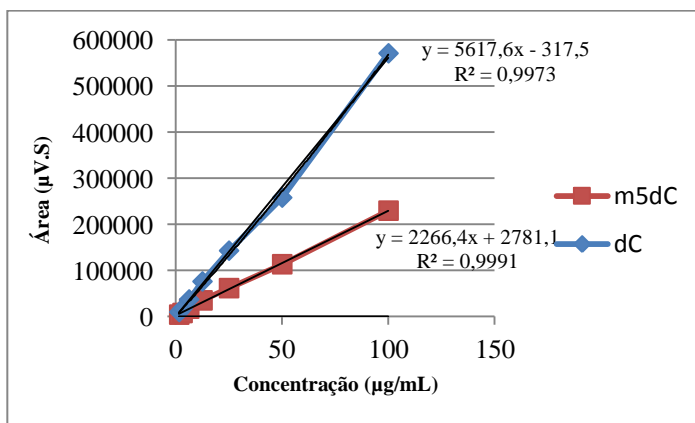


Figura A9 – Curva de calibração do método empregado para quantificação da citosina e da 5-metilcitosina no ensaio da metilação do DNA.

O limite de quantificação do método aplicado foi definido como sendo o primeiro ponto da curva de calibração, ou seja, 1,56 µg/mL. A Figura A10 apresenta o cromatograma de um ponto da curva de calibração com as bases padrões do DNA.

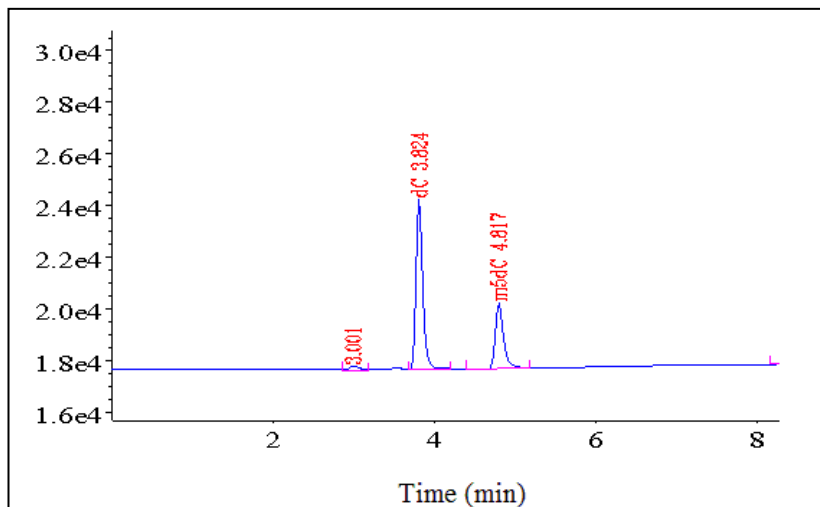


Figura A10 – Cromatograma das bases padrões do DNA empregados para a quantificação da citosina e da 5-metilcitosina (6,25 µg/mL).

2. Resultados das leituras das áreas dos picos de dC e m⁵dC, e resultado final da quantificação da 5-metilcitosina.

A Tabela A32 demonstra os valores encontrados nas leituras das áreas dos picos da citosina e da 5-metilcitosina, realizadas através do HPLC, e os cálculos empregados para obtenção da quantificação da taxa de m⁵dC. A taxa de m⁵dC (%) é calculada utilizando-se a seguinte fórmula:

$$m^5dC (\%) = (m^5dC / dC + m^5dC) * 100$$

Tabela A32 – Valores das áreas dos picos de citosina e 5-metilcitosina para obtenção da quantificação da taxa de m⁵dC.

Amostras	dC	m ⁵ dC	soma da áreas	taxa de m ⁵ dC (%)	Média m ⁵ dC	DP
c+a	11667	472	12139	3,89	3,82	0,09
c+b	2562	100	2662	3,76		
c-a	2003	262	2265	11,57	9,99	2,23
c-b	4487	412	4899	8,41		
1a	1481	280	1761	15,90	15,49	0,59
1b	2130	378	2508	15,07		
2a	2237	446	2683	16,62	14,01	3,69
2b	2464	317	2781	11,40		
3a	49964	658	50622	1,30	1,01	0,41
3b	133369	958	134327	0,71		
4a	3678	511	4189	12,20	10,64	2,20
4b	3484	348	3832	9,08		
5b	2850	487	3337	14,59	14,59	0,00
6a	2843	556	3399	16,36	15,84	0,73
6b	1044	189	1233	15,33		
7a	2168	995	3163	31,46	30,91	0,77
7b	1465	639	2104	30,37		
8a	3532	883	4415	20,00	21,47	2,08
8b	2318	690	3008	22,94		
9a	5016	450	5466	8,23	6,00	3,16
9b	3941	154	4095	3,76		
10a	2215	611	2826	21,62	14,00	10,78
10b	15140	1031	16171	6,38		

A7. UTILIZAÇÃO DO SOFTWARE WTox

A sequencia de passos a seguir demonstra como se utiliza o software WTox.

Passo 1: Janela inicial do WTox.

The screenshot shows the 'Modelo WTox para Avaliar e Classificar Risco Ambiental Toxicológico' window. It features three tabs: 'Cálculo do Risco Toxicológico', 'Estimativa de Impacto Ambiental', and 'Adicionar Variável Toxicológica'. The 'Cálculo do Risco Toxicológico' tab is active, displaying three rows for adding variables:

- Efeito Agudo:** Variable 'CE50', Gravity 'I', and an 'Incluir' button.
- Efeito Crônico:** Variable 'REPRODUCAO+', Gravity 'I', and an 'Incluir' button.
- Efeito Genotóxico:** Variable 'm5dC', Gravity 'I', and an 'Incluir' button.

A 'Limpar Dados' button is located to the right of the 'Efeito Crônico' row. Below these rows is a table with the following columns: 'Efeito', 'Valor', 'Organismo', 'Nível', 'Gravidade', and 'Risco'. A 'Calcular Risco' button is positioned at the bottom right of the interface.

Figura A11 – Janela inicial do WTox.

Passo 2: Preenchimento com dos dados obtidos através dos testes toxicológicos e definição da gravidade pelo usuário do software.

Efeito	Valor	Organismo	Nível	Gravidade	Risco
Agudo	70.71	CE50	E	IV	MARGINAL
Crônico	19.82	REPRODUCAO+	D	III	REDUZIDO
Genotóxico	312.24	m5dC	A	II	CRITICO

Figura A12 – Preenchimento de dados observados para a amostra TX1 e gravidade no programa WTox.

Passo 3: Inclusão dos dados no programa. Nível e risco são definidos pelo software.

Efeito	Valor	Organismo	Nível	Gravidade	Risco
AGUDO	70.71	CE50	E	IV	MARGINAL
CRONICO	19.82	REPRODUCAO+	D	III	REDUZIDO
GENOTOXICO	312.24	m5dC	A	II	CRITICO

Figura A13 – Inclusão dos dados da amostra TX1 no programa WTox.

Passo 4: Cálculo do risco ambiental final para a amostra TX1. Acontece o cruzamento dos resultados individuais.

Modelo WTox para Avaliar e Classificar Risco Ambiental Toxicológico

Ajuda

Cálculo de Risco Toxicológico | Avaliação de Carga Tóxica | Adicionar Variável Toxicológica

Efeito Agudo: Variável Toxicológica: CE50, Gravidade: IV, Incluir

Efeito Crônico: Variável Toxicológica: REPRODUCAO+, Gravidade: III, Incluir

Efeito Genotóxico: Variável Toxicológica: m5dC, Gravidade: II, Incluir

Limpar Dados

Efeito	Valor	Organismo	Nível	Gravidade	Risco
AGUDO	70.71	CE50	E	IV	MARGINAL
CRONICO	19.82	REPRODUCAO+	D	III	REDUZIDO
GENOTOXICO	312.24	m5dC	A	II	CRITICO

Calcular Risco

Selecionar uma opção

O Risco Ambiental é SIGNIFICATIVO
Você gostaria de imprimir um relatório?

Sim Não Cancelar

Figura A14 – Cálculo do risco ambiental final da amostra TX1 através do software WTox.

A8. RESULTADOS - AVALIAÇÃO DE RISCO RISCO AMBIENTAL DE RESÍDUOS INDUSTRIAIS ATRAVÉS DO ÍNDICE PEEP (P)

No método PEEP utilizam-se as fórmulas:

$$TC = (CENO * CEO)^{1/2} \quad (\text{Equação 1})$$

$$TU = 100\% \text{ v/v efluente} \div TC \quad (\text{Equação 2})$$

O índice PEEP é representado pela letra P, na fórmula que articula todos os dados encontrados nos testes de toxicidade e a vazão.

$$P = \log_{10} \left[1 + n \left[\frac{\sum_{i=1}^N Ti}{N} \right] Q \right]$$

Os demais dados são representados na fórmula pelas seguintes letras:

P = valor numérico do PEEP

n = número de testes que exibiram resposta tóxica

N = número de testes aplicados

T = unidades tóxicas geradas por cada teste de toxicidade

Q = vazão do efluente (m³/h)

Para os cálculos referentes às amostras PP1, PP2 e PP3 considerou-se uma vazão de 3000 m³/h. Ainda, os valores de CENO e CEO foram simulados para a maioria dos testes realizados, já que apenas o teste de toxicidade crônica pode oferecer o valor exato de CENO e CEO.

Amostra PP1

Nos testes realizados com a amostra PP1, o teste agudo com *D. magna* não indicou efeito tóxico, e o teste com *V. fischeri* indicou baixa toxicidade da amostra, então, considerou-se para estes dois parâmetros CENO=CEO=0, portanto, TC=TU=0. Como estes dois testes não exibiram resposta tóxica, não foram contabilizados na fórmula PEEP.

No teste crônico com *D. magna*, a menor concentração testada foi 12,5% e nesta concentração houve aumento significativo na reprodução dos organismos. Assim, esta concentração foi considerada

como de menor efeito observado (CEO). Como não foram testadas concentrações abaixo de 12,5%, assumiu-se que a concentração 6,25% não induziria a efeitos crônicos (CENO).

No teste de lipoperoxidação, o aumento na taxa de MDA induzido pela concentração de 25% não foi considerado significativo, portanto assumiu-se que esta concentração seria a de menor efeito observado (CEO), e a metade desta concentração (12,5%) foi considerada como aquela que não induziria a efeitos tóxicos (CENO).

O resultado do teste de metilação do DNA indicou que houve aumento de 14,59% na taxa de m⁵dC do organismo exposto à amostra PP1 (na concentração de 25%), e 3,82% no organismo controle. Assim, considerou-se que uma concentração de 12,5% poderia induzir um aumento em torno de 7,5%, e uma concentração de 6,25% poderia induzir um aumento em torno de 3,75%, ou seja, um aumento menor do que o apresentado pelo controle negativo. Assim, considerou-se CENO = 6,25% e CEO = 12,5%.

A amostra PP1 induziu a formação de 3 micronúcleos, e o controle negativo apresentou 2 micronúcleos. Assim, considerou-se que 25% seria a concentração de menor efeito tóxico (CEO), e a metade desta concentração, 12,5% foi assumida como a concentração de efeito não observado (CENO).

A Tabela A33 resume os resultados dos testes realizados, aplicados para a obtenção do índice PEEP.

Tabela A33 – Resultados dos testes aplicados com a amostra PP1, para obtenção do índice PEEP.

Teste toxicológico	Resultado do teste	CENO (%)	CEO (%)	TC	TU
Agudo – <i>D. magna</i>	100%	0	0	0	0
Agudo – <i>V. fischeri</i>	91,93%	0	0	0	0
Crônico – <i>D. magna</i>		6,25*	12,5	8,84	11,31
Lpo (MDA)	55,77	12,5*	25	17,68	5,65
Met (m ⁵ dC)	14,59%	6,25*	12,5*	8,84	11,31
Micronúcleo	3	12,5*	25	17,68	5,65

*Concentração assumida

Considerou-se a aplicação de 6 testes de toxicidade, e destes, 4 apresentaram resposta tóxica.

$$P = \log_{10} [1 + 4 (33,92/6) \times 3000]$$

Assim, a aplicação dos resultados na fórmula para obtenção do índice PEEP, resultou em $P = 4,83$.

Amostra PP2

A amostra PP2 não induziu efeito tóxico à *D. magna*, assim, considerou-se para este parâmetro $CENO=CEO=0$, e portanto, $TC=TU=0$.

O teste com *V. fischeri* indicou alta toxicidade desta amostra. Considerando-se que a concentração de 19% é a CE_{50} , ou seja, concentração que imobiliza 50% dos organismos testados, então, assume-se que uma concentração de 0,07% não induziria a efeitos tóxicos, CENO. Desta forma, assumiu-se também, que uma concentração com o dobro deste valor (0,14%) causaria o menor efeito tóxico observado, CEO.

No teste crônico com *D. magna*, a menor concentração testada foi 12,5% e nesta concentração houve aumento significativo na reprodução dos organismos. Assim, esta concentração foi considerada como de menor efeito observado (CEO). Como não foram testadas concentrações abaixo de 12,5%, assumiu-se que a concentração 6,25% não induziria a efeitos crônicos (CENO).

No teste de lipoperoxidação, o aumento na taxa de MDA induzido pela concentração de 25% não foi considerado significativo, portanto assumiu-se que esta concentração seria a de menor efeito observado (CEO), e a metade desta concentração (12,5%) foi considerada como aquela que não induziria a efeitos tóxicos (CENO).

O resultado do teste de metilação do DNA indicou que houve aumento de 21,47% na taxa de m^5dC do organismo exposto à amostra PP2 (na concentração de 25%), e 3,82% no organismo controle. Assim, considerou-se que uma concentração de 6,25% poderia induzir um aumento em torno de 5,37%, e uma concentração de 3,125% poderia induzir um aumento em torno de 2,68%, ou seja, um aumento menor do que o apresentado pelo controle negativo. Assim, considerou-se $CENO = 3,125\%$ e $CEO = 6,25\%$.

A amostra PP2 induziu a formação de 14 micronúcleos, e o controle negativo apresentou 2 micronúcleos. Assim, considerou-se que 1,56% seria a concentração de menor efeito tóxico (CEO), e a metade desta concentração, 0,78% foi assumida como a concentração de efeito não observado (CENO).

A Tabela A34 resume os resultados dos testes realizados com a amostra PP2, aplicados para a obtenção do índice PEEP.

Tabela A34 – Resultados dos testes aplicados com a amostra PP2, para obtenção do índice PEEP.

Teste toxicológico	Resultado do teste	CENO (%)	CEO (%)	TC	TU
Agudo – <i>D. magna</i>	100%	0	0	0	0
Agudo – <i>V. fischeri</i>	19%	0,07*	0,14*	0,1	1000
Crônico – <i>D. magna</i>		6,25*	12,5	8,84	11,31
Lpo (MDA)	44,93	12,5*	25	17,68	5,65
Met (m ⁵ dC)	21,47%	3,125	6,25	4,42	22,62
Micronúcleo	14	0,78*	1,56*	1,10	90,90

*Concentração assumida

Considerou-se a aplicação de 6 testes de toxicidade, e destes, 5 apresentaram resposta tóxica.

$$P = \log_{10} [1 + 5 (1130,48/6) \times 3000]$$

Assim, a aplicação dos resultados na fórmula para obtenção do índice PEEP, resultou em $P = 6,45$

Amostra PP3

A amostra PP3 induziu efeito tóxico à *D. magna*. Sendo $CE_{50} = 51,76\%$, considerou-se para este parâmetro $CENO = 0,2\%$ e $CEO = 0,4\%$.

O teste com *V. fischeri* também indicou a alta toxicidade desta amostra. O valor de CE_{50} observado foi de 18,61%, então assumiu-se que uma concentração de 0,07% não induziria a efeitos tóxicos, CENO. Desta forma, assumiu-se também, que uma concentração com o dobro deste valor (0,14%) causaria o menor efeito tóxico observado, CEO.

No teste crônico com *D. magna*, a menor concentração testada foi 6,25% e nesta concentração houve aumento significativo na reprodução dos organismos. Assim, esta concentração foi considerada como de menor efeito observado (CEO). Como não foram testadas concentrações abaixo de 6,25%, assumiu-se que a concentração 3,125% não induziria a efeitos crônicos (CENO).

No teste de lipoperoxidação, o aumento na taxa de MDA induzido pela concentração de 25% não foi considerado significativo,

portanto assumiu-se que esta concentração seria a de menor efeito observado (CEO), e a metade desta concentração (12,5%) foi considerada como aquela que não induziria a efeitos tóxicos (CENO).

O resultado do teste de metilação do DNA indicou que houve aumento de 14% na taxa de m^5dC do organismo exposto à amostra PP3 (na concentração de 25%), e 3,82% no organismo controle. Assim, considerou-se que uma concentração de 12,5% poderia induzir um aumento em torno de 7%, e uma concentração de 6,25% poderia induzir um aumento em torno de 3,5%, ou seja, um aumento menor do que o apresentado pelo controle negativo. Assim, considerou-se $CENO = 6,25\%$ e $CEO = 12,5\%$.

A amostra PP3 induziu a formação de 3 micronúcleos, e o controle negativo apresentou 2 micronúcleos. Assim, considerou-se que 25% seria a concentração de menor efeito tóxico (CEO), e a metade desta concentração, 12,5% foi assumida como a concentração de efeito não observado (CENO).

A Tabela A35 resume os resultados dos testes realizados com a amostra PP3, aplicados para a obtenção do índice PEEP.

Tabela A35 – Resultados dos testes aplicados com a amostra PP3, para obtenção do índice PEEP.

Teste toxicológico	Resultado do teste	CENO (%)	CEO (%)	TC	TU
Agudo – <i>D. magna</i>	51,76%	0,2	0,4	0,28	353,55
Agudo – <i>V. fischeri</i>	18,61%	0,07*	0,14*	0,1	1000
Crônico – <i>D. magna</i>		3,125*	6,25	4,42	22,62
Lpo (MDA)	28,56	12,5*	25	17,68	5,65
Met (m^5dC)	14,0%	6,25*	12,5*	8,84	11,31
Micronúcleo	3	12,5*	25	1,10	90,90

*Concentração assumida

Considerou-se a aplicação de 6 testes de toxicidade, e destes, 6 apresentaram resposta tóxica.

$$P = \log_{10} [1 + 6 (1484,03/6) \times 3000]$$

Assim, a aplicação dos resultados na fórmula para obtenção do índice PEEP, resultou em $P = 6,65$.

A9. ARTIGO 1

ACUTE AND CHRONIC TOXICITY OF SOLUBLE FRACTIONS OF INDUSTRIAL SOLID WASTES ON *Daphnia magna* AND *Vibrio fischeri*.

Este artigo foi aceito para publicação na Revista Científica *The Scientific World Journal*. doi:10.1100/2012/643904

Letícia Flohr¹, Armando Borges de Castilhos Júnior² and William Gerson Matias^{1,*}

¹Laboratório de Toxicologia Ambiental, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil.

²Laboratório de Pesquisas em Resíduos Sólidos, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil.

*Corresponding author: Prof. William Gerson Matias, Dr.

Laboratório de Toxicologia Ambiental, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário, Caixa Postal 476, CEP 88.010-970, Florianópolis, SC, Brasil. Telephone number: + 55 48 3721-7742; Fax number: +55 48 3721-9823. E-mail address: will@ens.ufsc.br

Abstract

Industrial wastes may produce leachates that can contaminate the aquatic ecosystem. Toxicity testing in acute and chronic levels are essential to assess environmental risks from the soluble fractions of these wastes, since only chemical analysis may not be adequate to classify the hazard of an industrial waste. In this study, ten samples of solid wastes from textile, metal-mechanic and pulp and paper industries were analyzed by acute and chronic toxicity tests with *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri*. A metal-mechanic waste (sample MM3) induced the highest toxicity level to *Daphnia magna* ($CE_{50,48h} = 2.21\%$). A textile waste induced the highest toxicity level to *Vibrio fischeri* (sample TX2, $CE_{50,30min} = 12.08\%$). All samples of pulp and paper wastes, and a textile waste (sample TX2) induced chronic effects on reproduction, length and longevity of *Daphnia magna*. These results could serve as an alert about the environmental risks of an inadequate waste classification method.

Keywords: Industrial waste, *Daphnia magna*, *Vibrio fischeri*.

1. INTRODUCTION

Industrial processes generate wastes that must be adequately treated before final disposal, since the environmental risk involved is very important. An inappropriate industrial waste treatment and disposal releases toxic compounds that can contaminate the ground and water bodies [1].

Standardized methods, like the Brazilian Waste Classification Method – NBR 10004 [2], characterizes the hazard of industrial wastes based only in chemical analysis, or in toxicity tests with mammals. When considering environmental safety in aquatic ecosystems, these methods may be inadequate, because industrial solid wastes are complex mixtures composed of various toxic substances [3, 4]. Even if each one of these compounds is present in low concentrations, synergistic and additive effects can potentiate the toxicity of mixtures [5, 6]. Therefore, the most appropriate way to evaluate toxic effects of the bioavailable fraction of wastes would be by bioassays [7].

Aquatic environmental bioindicators like bacteria and microcrustaceans can demonstrate the toxicity potential of industrial effluents and waste leachates without the necessity of knowing all chemical substances presented in the sample [8, 9]. Toxicity effects are observed on biological parameters such as mortality, growth and reproduction [10-12]. The observed effects are statistically analyzed and the results are expressed in numerical units, such as EC_{50} and NOEC [13].

Taking into account the great production of solid waste in industrial activities and the environmental risk involved in its generation, treatment and disposal, this study aims to assess the acute and chronic toxicity of soluble fraction of industrial waste samples using the test organisms *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri*. These results could help to improve the current Brazilian Waste Classification Method, by proposing a battery of bioassays that may provide a more complete evaluation of industrial wastes hazard.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Waste Sampling

Field sampling was performed according to the procedures of the NBR 10007 [14], and laboratory sampling was based on the Leaching Flowchart - Appendix B - NBR 10005 [15]. Ten samples, each one from a different industry, were collected at the entrance of an industrial and sanitary landfill located in the city of Blumenau, SC – Brazil. Before entering the landfill, each sample must be previously

classified according to NBR 10004 method [1]. APHA methodologies [16] are used to obtain the chemical characterization of these wastes. Different samples of the same type of waste were chosen according to their chemical characterization. Only samples of the same type of waste with very close chemical composition were collected, so it was possible to obtain the average values of chemical parameters from each type of waste. Sample characteristics are described in Table 1, according to their waste classification report. [Insert Table 1 about here].

2.2 Samples preparation

Samples preparation was carried based on the NBR 10005 [14], with modifications. During this process, pH was not corrected in order to maintain the original chemical characteristics of the samples analyzed. 100 g of raw sample were introduced in a flask and filled with 2.0 L of distilled water, and the bottle was stirred for 18 hours with a rotation of 30 rpm in a rotary shaker. After stirring, the samples had their pH and dissolved oxygen (DO) measured, and the supernatant was used to carry out the toxicity tests.

2.3 Toxicity Tests

2.3.1 *Daphnia magna* cultivation

Cultivation of *Daphnia magna* Straus, 1820, was performed according to ISO 6341 [17] and DIN 38412-30 [18]. Beakers with a capacity of 1500mL of M4 culture medium were used for the growth of 25 to 30 individuals. The organisms were fed with *Scenedesmus subspicatus* algal culture, produced under ISO 8692 [19], in the CHU culture medium [20]. Cultures were kept under temperature controlled at $20 \pm 2^\circ\text{C}$, 16-hour light photoperiod, and $\text{DO} \geq 2.0 \text{ mg/L}$.

2.3.2 *Daphnia magna* acute toxicity test

Acute toxicity tests were performed according to NBR 12713 [21]. Samples were diluted with ISO medium, according to ISO 6341 [17] in four concentrations: 100, 50, 25 and 12.5%. For each concentration, 50 mL of diluted sample was prepared, and then, the solution was separated in two beakers, each one with 25 mL of the dilution. In each beaker 10 young *D. magna* (between 2 and 26 hours of life) were inserted, resulting in an observation of the effects on immobility of 20 individuals. Organisms were exposed to these conditions for 48 hours without food and light, controlled temperature of $20 \pm 2^\circ\text{C}$ and $\text{OD} \geq 2.0 \text{ mg/L}$. 20 organisms of control group were exposed to ISO medium, and kept under the same environmental

conditions of the cultivated organisms. According to EPA 821-R-02-012 [22], the Trimmed Spearman-Kärber Method was used to calculate $CE_{50,48h}$.

2.3.3 *Daphnia magna* chronic toxicity test

21 days chronic toxicity tests were performed according to ISO 10706 [23], Bianchini and Wood [24] and Knops et al. [9], with modifications. The following endpoints were analyzed: fecundity (neonates number), longevity (surviving organisms), and growth (organisms length). Each test was conducted with four sample dilutions, and a negative control (M4 medium). The dilutions were prepared according to the results observed in acute toxicity tests, and in a short chronic toxicity test of 6 days. Sample's dilution followed a geometric progression model in the ratio of 2, except for samples MM1 and MM3, and was prepared at the time of organism exposure, using appropriate proportions of sample and reconstituted water (M4 medium). For each dilution, 10 replicates were used, disposing 10 young *Daphnia magna* in 50mL individual beakers. Each beaker received an aliquot of 25mL test solution and was covered with plastic wrap to prevent evaporation and contamination with any residue suspended in the air. The tests were kept under the same environmental conditions of the cultivated organisms (16-hour light photoperiod, temperature $20 \pm 2^\circ\text{C}$ and $OD \geq 2.0 \text{ mg/L}$). *D. magna* were fed with *Scenedesmus subspicatus* algae, and the media was changed every 48 hours. The organisms were checked daily and the number of survival organisms and living neonates were registered. According to EPA 821-R-02-013 [25] the results were analyzed using Dunnett tests or t-test with Bonferroni adjustment, through the Dunnett Program version 1.5 [26]. A significance level of $p < 0.05$ was accepted.

2.3.4 *Vibrio fischeri* toxicity test

Toxicity tests with marine luminescent bacteria *Vibrio fischeri* were performed according to ISO 11348-3 [27], and according to the methodology developed for the equipment Microtox® 500 [28]. The principle used for the determination of toxicity is the inhibition of luminescence emitted by the bacteria when in contact with the sample. Exposure time was 30 minutes, and $EC_{50,30min}$ (%) was calculated by the equipment's software.

3. RESULTS

3.1 Physicochemical Characteristics of Industrial Wastes

According to the composition of wastes presented in Table 1, barium, cadmium, chromium, iron, lead and zinc are the principal components of the soluble fractions of textile wastes. The chemical analysis of the dry weight portion indicates that despite metals, cyanides and phenol also composes the textile wastes. Chemical characterization of metal-mechanical wastes indicates that chlorides, chromium, iron and zinc are components of the dry weight portion. Zinc is the main component of the soluble fraction of these wastes. The dry weight portions of samples of pulp and paper wastes are composed by arsenite, lead, chromium, phenol and mercury. Cadmium, lead and chromium are the main components of the soluble fraction.

3.2 *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri* Acute Toxicity Tests

The results of *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri* acute toxicity tests are presented in Table 2. [Insert Table 2 about here] All samples of soluble fractions of industrial solid waste had pH and dissolved oxygen (DO) value in accordance with the recommendations for acute toxicity tests with *Daphnia magna* (pH between 5.0 and 9.0, DO \geq 2.0 mg/L). All bacteria batches used in toxicity tests were sensitive to zinc sulfate ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) and correction factor (fk) within optimal values for the feasibility of the toxicity tests. Samples of soluble fraction of textile waste induced varied acute toxicity effects to both *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri*. Samples TX3 and TX4 induced toxicity effects to both organisms tested, while sample TX2 induced no toxicity to *Daphnia magna*, and sample TX1 induced no toxicity to *Vibrio fischeri*. Sample TX1 induced little acute toxicity effects to *D. magna*, since $\text{EC}_{50,48\text{h}} = 70.71\%$. Sample TX2 induced toxicity effects only to *V. fischeri*, since $\text{EC}_{50,30\text{min}} = 43.77\%$. Sample MM3, soluble fraction of metal-mechanic waste, induced the highest toxicity value of all ten samples. At the end of 48 hours of testing, all organisms observed were immobile. Sample MM2 induced toxicity effects to *V. fischeri*, but did not induced serious toxicity effects to *D. magna*. Sample MM1 did not induce significative toxicity effects in these same organisms. Soluble fractions of metal-mechanic waste induced to values of $\text{EC}_{50,30\text{min}}$ quite varied, no sample showed similar toxicity. Samples PP1 and PP2, soluble fraction of pulp and paper mill waste, induced no toxicity to *Daphnia magna*, since $\text{EC}_{50,48\text{h}} > 100\%$. Sample PP1 induced little toxicity to *Vibrio fischeri*

($EC_{50,30min} = 91.93\%$). Sample PP3 induced acute toxicity effects to both *D. magna* and *V. fischeri*.

3.3 *Daphnia magna* Chronic Toxicity Tests

3.3.1 Soluble Fraction of Textile Waste

In Table 3 it is possible to note that only one sample of soluble fraction of textile waste induced no chronic effect. The remaining samples induced toxic effects in at least one of the observed concentrations. [Insert Table 3 about here] Samples TX1 and TX4 induced no effects on *Daphnia magna* reproduction, since neonates mean were not significantly different than those of control for any concentrations tested. In organisms exposed to sample TX2 the neonates mean was significantly higher than the control at 12.5 and 25% concentrations. Sample TX3 induced significant chronic effects to reproduction in all concentrations tested, increasing the number of neonates. Longevity effects were induced by samples TX2 and TX4. In sample TX2, at 12.5% concentration, only one organism survived after 21 days, and at 25% concentration, no organism survived until the end of the test. In organisms exposed to sample TX4, effects were observed at 12.5% concentration, where only four organisms survived until the end of the test. Mortality was reported for organisms exposed to samples TX1 and TX3, but these do not represent a significantly lower mean than that observed in the control. Organisms' growth was also evaluated after 21 days of testing and only sample TX2 (at 6.25% concentration) induced significant growth effects on *Daphnia magna*. These organisms had a growth mean higher than those of the control group.

3.3.2 Soluble Fraction of Metal-Mechanic Waste

Table 4 indicates the results regarding the effects on *Daphnia magna* exposed to soluble fractions of metal-mechanic waste in samples MM1, MM2 and MM3. [Insert Table 4 about here] In organisms exposed to sample MM1 the neonates mean was significantly higher when compared to control (at 1.56 and 1.04% concentrations). Sample MM3 induced reproduction effects for all concentrations tested. Sample MM2 induced significant increases in reproduction at 25% concentration, and significant decreases at 50% concentration. Even without generating significant number of neonates, all organisms at 50% concentration showed eggs at the end of the test, indicating a possible delay in the development of reproductive organs of *D. magna*. The number of neonate increases at 6.25 and 12.5% concentrations, but this was not significantly higher than those of the control. Longevity of

Daphnia magna exposed to all samples of soluble fractions of metal-mechanic waste was not significantly affected. Most organisms survived the 21 day trial. Sample MM1 induced no growth effects on *Daphnia magna*. In organisms exposed to sample MM3 (at 1.56% concentration) there was a significant length increase. Organisms exposed at 50% concentration of sample MM2 (the highest concentration tested) had a significantly lower growth in relation to the control group.

3.3.3 Soluble Fraction of Pulp and Paper Waste

Table 5 indicates the results regarding to the effects on *D. magna* exposed to soluble fractions of pulp and paper mill waste in samples PP1, PP2 and PP3. [Insert Table 5 about here] Sample PP1 induced *Daphnia magna* reproduction effects. Significant increases in the number of neonates were observed at all concentrations, except at 100%. In organisms exposed to sample PP2 it was noted that the number of neonates produced at 12.5, 25 and 50% concentrations were higher than the control group. At 100% concentration, number of neonates was significantly lower than those of control. All samples induced longevity effects on *Daphnia magna* exposed to the highest concentration tested. In sample PP1 only three organisms at 100% concentration survived after 21 days. In sample PP2 only 4 organisms of 100% concentration survived after 21 days, and in sample PP3 no organisms of the highest dilution (50%) survived at the end of the test. All samples induced growth effects on *Daphnia magna*. In organisms exposed to samples PP1 and PP2 the effects was observed at 100% concentration. Sample PP3 induced growth effects in all concentrations tested.

4. DISCUSSION

Chemical analysis confirm the presence of toxic components in the soluble fractions of all wastes analyzed, but the results of bioassays shows that they induced varied toxicity effects to both *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri*. In textile wastes, results observed in the organisms exposed to samples TX1 and TX2, can be compared to those reported by Sponza and Isik [29] and Rosa et al. [30]. These researchers observed that textile effluent and textile sludge did not induce acute toxicity effects in *D. magna* and *V. fischeri*, respectively. They concluded that the non toxic effects were related to the efficiency of the textile treatment plant and textile sludge stabilization. The result of acute toxicity to *D. magna* found for sample TX3 can be compared to those observed by Villegas-Navarro et al. [31], who evaluated the acute

toxicity to *D. magna* of five textile effluents and found values of $CE_{50,48h}$ between 66.66 and 13.89% at the exit of the effluent treatment system. Researchers also observed physicochemical parameters such as hardness, conductivity and pH and concluded that these factors may have contributed to the effluents toxicity. Nevertheless, they have not discarded the influence of other factors that may induce toxicity. Our data suggest that the presence of metals like cadmium and iron could be related to the acute toxicity effects. Soetaert et al. [32] observed effects at the molecular level in *Daphnia magna* exposed to sublethal concentrations of cadmium for 48 hours: digestion, oxygen transport, cuticula metabolism and embryo development were affected. Data related with immune and stress response, cell adhesion, visual perception and signal transduction were also found by these researchers. Sample TX4 induced an acute toxicity to *Daphnia magna* that can be compared with the results observed by Rosa et al. [30], who analyzed the acute toxicity of fresh sludge from a textile treatment plant and observed $CE_{50,48h} = 47.88\%$. Researchers also found high concentrations of phenol, aluminum and iron in these samples, which may be the cause of the observed toxicity. Phenol and iron also were found in our samples of textile sludge, therefore one can assume that the acute toxicity effects may have been caused by these substances. Sample TX4 induced toxicity effects in *V. fischeri* that can be compared to those reported by Grinevicius et al. [33]. The researchers analyzed the untreated effluent from a textile industry and found that $EC_{50,15min}$ was 10.64% for *Vibrio fischeri*. They concluded that the untreated effluent toxicity can be linked with the high amounts of dyes, metals, surfactants, fixing and bleaching agents that are used in the various proceedings in the textile industry.

In the chronic toxicity investigations with *D. magna*, it is interesting to note that despite the evidence of acute toxicity induced by sample TX4, there were no toxicity effects on *D. magna*'s reproduction. Sample TX1 also did not induce chronic toxicity effects to *D. magna*. Knops et al. [9], exposed *Daphnia magna* to cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), a cationic surfactant used in textile processing as an effluent color remover [34], and reproduction was not significantly affected. Even observing oxygen consumption decreases, and body size reductions, researchers were unable to relate these factors with effects on reproduction. In organisms exposed to sample TX2, the concentrations that showed significant increases in reproduction were the same that showed high mortality of organisms at the end of the test. Reproduction increases followed by high mortality, would explain a

forced attempt of species conservation [35]. The high mortality observed after 21 days exposition to sample TX2 (at 12.5 and 25% dilutions) may have been caused by the presence of metals like lead and zinc (Table 1). According to Cooper et al. [36], Zn (0.0179 mg/L) caused 90% of mortality, and Pb (0.2164 mg/L) caused 70% of mortality on *C. dubia* after a 7 days exposition. The combination of these two substances caused 60% of mortality on *C. dubia* after the same period of exposition [36]. Textile sludge contains nitrogen, phosphorous and potassium, and these nutrients may induce growth increases in plants, algae and earthworms [30]. This same stimulating potential may explain growth effects observed when *D. magna* was exposed to sample TX2.

A metal-mechanic waste (sample MM3) induced the highest acute toxicity value of all ten samples analyzed. Lambolez et al. [37] also found high toxicity effects in *Daphnia magna* and *Photobacterium phosphoreum* induced by a metal slag leachate. It was considered the most toxic of all samples analyzed, and also induced mutagenic effects in *R. subcapitata*. Kang et al. [38] evaluated the toxicity induced by effluents from an electronics factory in *Daphnia magna*. The final effluent induced a significant toxicity to *D. magna*, since EC_{50,48h} was 15.38%. The researchers also conducted chemical analysis and toxicity has been linked to salinity of sodium hypochlorite (NaOCl) from the effluent treatment process. Chlorides were also found in the dry weight portion of our samples, and the presence of this substance could explain the toxicity effects observed in organisms exposed to sample MM3. Samples MM1 and MM2 induced varied toxicity effects to both *D. magna* and *V. fischeri*. The interaction of chemical substances like lead, nickel and zinc (Table 1) could have caused the synergistic and antagonistic effects to both organisms. Zinc affects negatively the uptake of nickel by *D. magna*; on the contrary, the presence of zinc stimulates the uptake of lead in this organism [39]. A binary mixture of lead and zinc induces synergistic effects to *V. fischeri* [40]. Picado et al. [41] found quite varied toxicity effects in *Vibrio fischeri* exposed to effluents from a metal industry. They observed metal concentration in these samples, and found exceeded limit values of chromium, cooper and iron.

Chronic toxicity tests shows that sample MM2 induced increases in reproduction at 6.25, 12.5 and 25% concentration, and significant decreases at 50% concentration. This same effect, known by hormesis, was observed by Rodriguez et al. [11], in *Daphnia magna* exposed to two metal surface coating effluents. These effluents

contained metals like Ni, Zn, and Cr, and the researchers affirm that their presence may explain the reproduction effects. Our samples from soluble fraction of metal-mechanic wastes are also composed by these same metals, therefore we can relate their presence with the observed effects. However, the processes that lead to higher quantities of neonates when they come in contact with low concentrations of pollutants must be further analyzed [11].

Soluble fractions of pulp and paper wastes induced varied toxicity effects. The integration of toxic compounds present in sample PP1 may have produced antagonistic effects to both *D. magna* and *V. fischeri*, since these organisms were not affected. The presence of selenium (Table 1) may explain this observation. Hamilton et al. [42] related a delay in mortality of *Xyrauchen texanus* larvae, possibly due to the interaction of Se with other substances in water and food treatment. Sample PP2 induced the same effect to *D. magna*. On the contrary, sample PP3 induced acute toxicity effects to *D. magna* similar to those reported by Picado et al. [41]. These researchers reported $CE_{50,48h} = 51\%$ for *D. magna*, and the evaluation of some physicochemical parameters showed that BOD, COD, TSS, oil and greases exceeded the limit values of a Portuguese law. The toxicity effects induced by sample PP3 can also be related to the presence of cadmium, lead and chromium in the soluble fractions of pulp and paper wastes. Even if the amount of each toxic substance is below the limits imposed by the Brazilian law NBR 10004 [2], synergistic and additive effects could be responsible for the observed toxicity. Integration of toxic compounds from samples PP2 and PP3 could also have induced the toxic effects in *V. fischeri*. Our results can be compared to those observed by Kostamo and Kukkonen [43], who reported $EC_{50,30min}$ values between 13 and 19% for *V. fischeri* exposed to samples of untreated pulp and paper mill effluent. Researchers also found high concentrations of resin acids and sterols in the total effluent sample. These components were not investigated in our work, but the dry weight portion of our samples contains phenol, which could have contributed to the toxicity effects.

Reproduction effects were observed in organisms exposed to sample PP2. It was noted that the number of neonates produced at 12.5, 25 and 50% concentrations were higher than the control group. At 100% concentration, number of neonates was significantly lower than those of control. These results indicate hormesis in sample PP2, similar to that found by Middaugh et al. [44], who detected the same effect in the reproduction of *Ceriodaphnia dubia* during 7 days of exposure to a pulp and paper mill effluent. Researchers affirm that hormesis can be related

to nutritional components presented in these effluents. Biologically treated bleached kraft pulp mill effluent contains phosphorous and carbon [45]. These nutrients could have influenced *D. magna*'s reproduction effects induced by samples PP1 and PP2. Sarakinos and Rasmussen [46] observed these same mortality effects in *Ceriodaphnia dubia* exposed to water from a river that receives pulp and paper mill effluents. After a 7 days chronic survival test, reported value of EC₅₀ was 23.9%, and the researchers affirm that effects may be attributed to BOD, suspend solids, and different exposure routes, like nutrition. The presence of lead and chromium in the soluble fractions of samples PP1 and PP2 may also have contributed to the mortality observed. According to Seco et al. [47] the sublethal concentrations of these two metals for *D. magna* are 0.55 mg/L for Pb and 0.043 mg/L for Cr. Table 1 shows that in the soluble fractions of our samples these concentrations exceed the ideal limits for sublethal concentrations. All samples of pulp and paper wastes induced growth effects on *Daphnia magna*. The length of the adult organism decreased as concentration increased. These results can be compared to those reported by Knops et al. [9], who exposed *D. magna* to different cadmium concentrations, and significant length decreases were observed at the higher dilutions. Chemical characterization of our samples from pulp and paper wastes indicates the presence of cadmium, therefore, growth effects induced by sample MM2 could be attributed to this substance.

Our results indicate that there is a considerable variability between the different waste toxicity, and also between samples of the same type of waste. Lambolez et al. [37] made these same observations and affirmed that the waste's type can not inform about toxicity effects from the leachates.

When comparing our toxicity tests results with the Brazilian Waste Classification Method - NBR 10004 [2], it is possible to note that, despite the fact that all wastes were classified as Class II A (non-hazardous and non- inert), only sample TX1 induced low acute toxicity and no chronic toxicity effects to the organisms tested. According to NBR 10004, only Class I wastes may exhibit the toxicity characteristic. This leads to the thought that maybe this classification method has an underestimated toxicity assessment, disregarding the harmful effects of industrial landfill toxic loads in aquatic ecosystems. Similar results were reported by Silva et al. [48], who applied a battery of acute toxicity tests with *Scenedesmus subspicatus*, *Vibrio fischeri* and *Daphnia magna* to textile, metal-mechanics, and automotive solid wastes. The researchers observed that in some cases, the hazardous potential of industrial sludge

was underestimated, so they affirm that the current Brazilian regulation (NBR 10004) is not always appropriate to evaluate the environmental impact from a solid waste. Thus, we can conclude that the use of chemical characterization to promote wastes classification is outdated and must be reviewed. Synergistic, additive and antagonistic effects of complex mixtures cannot be predicted only by chemical analyses, and bioassays are more appropriate to effectively demonstrate toxicity levels in aquatic environments. Therefore, they should be included in the Brazilian methodologies for waste classification.

When comparing acute and chronic toxicity tests, it is possible to confirm the great importance of chronic tests with *Daphnia magna*, since six of ten samples showed no significant acute effects, but presented chronic effects in at least one of the observed variables (reproduction, growth and longevity). Results from the *Vibrio fischeri* toxicity tests, once again confirm the importance of chronic tests with *Daphnia magna*. Samples MM1 and PP1, induced few toxicity effects on *V. fischeri*, but chronic effects were observed in the microcrustacean. Table 6 summarizes results for acute and chronic effects for each sample. [Insert Table 6 about here]

Only sample TX1, considered to have low toxicity according to the acute tests with *Vibrio fischeri* and *Daphnia magna*, induced no chronic effects. Samples TX2 and PP2 were toxic to *Vibrio fischeri*, but no acute toxicity was observed to *Daphnia magna*. However, these two samples induced chronic effects in *D. magna*'s reproduction, length and survival. De Coen and Janssen [49] affirm that digestive enzyme activity monitored after 48h in *Daphnia magna* may be a good indicator of chronic toxicity levels, since digestive enzyme activity increases may reveal the way the organism deals with reduced absorption of food caused by a change in the efficiency of food assimilation. This hypothesis may explain the results observed in samples TX2 and PP2. Increases in digestive enzyme activity in these organisms may have caused the reproductive and physiological changes observed. Despite this, it is not possible to discard other factors that could have induced chronic effects in these samples. In chronic toxicity tests, biological characteristics may be related to many toxicity processes: (i) effects on digestive enzyme activity can be related with the inhibition on energy consumption and acquisition, which may affect the amount of food consumed and consequently interfere on the length of adult organisms; (ii) effects in vitellogenesis may alter the number of neonates produced [50]. Endocrine-active substances are involved in various industrial processes, and especially in pulp and paper industry effluents,

compounds like steroids, resinic acids and triglycerides, are responsible for chronic hormonal and physiological effects [51]. So it seems that chronic toxicity effects can be caused by multiple factors.

Samples MM1 and MM2 induced no significant acute effects for either *V. fischeri* and *D. magna*, but some chronic effects were observed. Sample MM1 induced chronic effects on reproduction, and sample MM2, on *Daphnia magna*'s reproduction and growth. The highlight occurs for sample PP1, which did not induce acute toxicity in neither of the two organisms tested, but chronic effects were observed on *D. magna*'s reproduction, length and survival. These same observations were made by Mendonça et al. [52], and they affirm that occurrence of chronic effects on *Daphnia magna* exposed to low concentrations is important, since effluent samples did not show great acute toxicity for any of the other organisms tested (*Vibrio fischeri*, *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Thamnocephalus platyurus*, *Daphnia magna* and *Lemna minor*). Without chronic toxicity testing samples MM1, MM2 and PP1 probably would not be considered toxic, and the environmental risk of these wastes would not be classified as dangerous.

Samples TX3, TX4, MM3 and PP3 had demonstrated significant toxicity potential as observed in acute tests with *Vibrio fischeri* and *Daphnia magna*. This toxicity potential was confirmed again by chronic toxicity testing with *D. magna*. Sample MM3 induced chronic effects on reproduction and growth. Sample TX3 induced reproductive effects and sample TX4 induced longevity effects. Sample PP3 induced effects on all parameters observed.

Results found after the application of the three types of toxicity tests showed that *Vibrio fischeri* is more sensitive than *Daphnia magna* in acute toxicity tests. Interestingly, *Vibrio fischeri* tests could predict chronic toxicity in *Daphnia magna*, in seven of ten tests it was possible to note that when *V. fischeri* showed acute toxicity, some chronic effect was also observed. The same was observed in only four acute tests with *Daphnia magna*. So it is important to realize the three tests together, for a more complete evaluation of toxicological effects of soluble fractions of industrial waste.

In conclusion, considering that decision-making to improve an environmental situation requires reliable measures, the use of methods that can together assess acute and chronic effects provide a more complete evaluation of toxicological effects of soluble fractions of industrial solid wastes, and warn about the environmental problems caused by an inadequate waste classification, treatment and disposal.

Acknowledgments

We acknowledge the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Brazil for financial support. The authors would like to thank Aterro Industrial e Sanitário de Blumenau - SC, for providing industrial solid waste samples. The authors wish to thank Cristina H. da Costa and Cristiane F. Fuzinato for helping in the laboratory procedures. We would like to thank Flávia Azevedo for helping in the translation of this paper into English. The authors declare that they have no direct financial relation with Microtox®, and thus there are no conflicts of interest.

REFERENCES

1. G. Hamer , “Solid waste treatment and disposal: effects on public health and environmental safety”. *Biotechnology Advances*, vol. 22, pp. 71–79, 2003.
2. J. Martins, L. Oliva Teles, and V. Vasconcelos, “Assays with *Daphnia magna* and *Danio rerio* as alert systems in aquatic toxicology”. *Environment International*, vol. 33, pp. 414–425, 2007.
3. C. L. S. Sisinnio, “Non-inert industrial solid waste disposal in landfill dumps: evaluation of toxicity and implications for the environment and human health”. *Cadernos de Saúde Pública*, vol. 19, no. 2, pp. 369-374, 2003.
4. D. Baderna, S. Maggioni, E. Boriani et al., “A combined approach to investigate the toxicity of an industrial landfill’s leachate: Chemical analyses, risk assessment and *in vitro* assays”. *Environmental Research*, vol. 111, pp. 603–613, 2011.
5. R. P. Schwarzenbach, B. I. Escher, K. Fenner et al., “The challenge of micropollutants in aquatic systems”. *Science*, vol. 313, 1072-1077, 2006.
6. B. M. Wilke, F. Riepert, C. Koch, and T. Kühne, “Ecotoxicological characterization of hazardous wastes”. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 70, pp. 283-293, 2008.
7. S. Parvez, C. Venkataraman, and S. Mukherj, “A review on advantages of implementing luminescence inhibition test (*Vibrio fischeri*) for acute toxicity prediction of chemicals”. *Environment International*, vol. 32, no. 2, pp. 265–268, 2006.
8. V. Tigini, P. Giansanti, A. Mangiavillano, A. Pannocchia, and G. C. Varese, “Evaluation of toxicity, genotoxicity and environmental risk of simulated textile and tannery wastewaters with a battery of

- biotestes” . *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol.74, no. 4, pp. 866 -873, 2011.
9. M. Knops, R. Altenburger, and H. Segner, “Alterations of physiological energetics, growth and reproduction of *Daphnia magna* under toxicant stress”. *Aquatic Toxicology*, vol. 53, pp. 79–90, 2001.
 10. A. Pintar, M. Besson, P. Gallezot, J. Gibert, and D. Martin, D., “Toxicity to *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri* of kraft bleach plant effluents treated by catalytic wet-air oxidation”. *Water Research*, vol. 38, pp. 289–300, 2004.
 11. P. Rodriguez, M. Martinez-Madrid, and A. Cid, “Ecotoxicological assessment of effluents in the Basque country (Northern Spain) by acute and chronic toxicity tests using *Daphnia magna* Straus”. *Ecotoxicology*, vol. 15, pp. 559–572, 2006.
 12. M. A. Aragão, R. P. A. Araújo, “Métodos de ensaios de toxicidade com organismos aquáticos”. In “Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações”, edited by P. A. Zagatto and E. Bertoletti. São Carlos: Editora Rima, pp. 117–147, 2006.
 13. Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT, “Sampling of solid waste – NBR 10007 ”. Rio de Janeiro, Brazil, 2004a.
 14. Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT, “Procedure for obtention leaching extract of solid wastes – NBR 10005”. Rio de Janeiro, Brazil, 2004b.
 15. Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT, “Solid Waste Classification – NBR 10004 ”. Rio de Janeiro, Brazil, 2004c.
 16. American Public Health Association – APHA, American Water Works Association – AWWA, Water Environment Federation – WEF, “Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater”, 21th ed. Washington, DC, 2005.
 17. International Organization for Standardization – ISO, “Water quality – Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) – ISO 6341”. Zurich, Switzerland, 1996.
 18. Deutsches Institut für Normung – DIN, “German standard methods for the examination of water, waste water and sludge; bio-assays (group L); determining the tolerance of *Daphnia* to the toxicity of waste water by way of a dilution series (L 30) - DIN 38412-30”. Berlin, Germany, 1989.
 19. International Organization for Standardization – ISO, “Water quality - Freshwater algal growth inhibition test with unicellular green algae – ISO 8692”. Zurich, Switzerland, 2004.

20. S. P. Chu, "The influence of the mineral composition of the medium on the growth of planktonic algae". *Journal of Ecology*, vol. 30, pp. 284–325, 1942.
21. Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT. "Aquatic ecotoxicology - Acute Toxicity - Test with *Daphnia* spp (Cladocera, Crustacea) – NBR 12713". Rio de Janeiro, Brazil, 2009.
22. U. S. Environmental Protection Agency – USEPA, "Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms – EPA-821-R-02-012". Washington, DC: Office of Water, U. S. Environmental Protection Agency, 2002a. Available from: <http://www.epa.gov/waterscience/methods/wet/disk2/atx.pdf>. Accessed 25 May 2011.
23. International Organization for Standardization – ISO, "Water quality – Determination of long term toxicity of substances to *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) - ISO 10706". Zurich, Switzerland, 2000.
24. A. Bianchini, and C. M. Wood, "Physiological effects of chronic silver exposure in *Daphnia magna*". *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, vol. 133, pp. 137–145, 2002.
25. U. S. Environmental Protection Agency – USEPA, "Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms – EPA-821-R-02-013". Washington, DC: Office of Water, U.S. Environmental Protection Agency, 2002b. Available from: http://water.epa.gov/scitech/methods/cwa/wet/upload/2007_07_10_methods_wet_disk3_ctf.pdf. Accessed 25 May 2011.
26. U. S. Environmental Protection Agency –USEPA, "Dunnett Program Version 1.5 Users' Manual". Cincinnati, OH: Environmental Monitoring Systems Laboratory, Ecological Monitoring Research Division, U.S. Environmental Protection Agency, 1999. Available from: www.epa.gov/nerleerd/stat2.htm. Accessed 16 June 2011.
27. International Organization for Standardization – ISO, "Water quality – Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test) – Part 3: Method using freeze-dried bacteria - ISO 11348-3". Zurich, Switzerland, 2007.
28. Azur Environmental, "Microtox Manual (1– 4)", 1997. Available from: www.sdix.com/uploadedFiles/Content/Products/Water_Quality_Test

- [s/MicrotoxOmni-Software-forWindows.pdf](#) Accessed 27 March 2011.
29. D. T. Sponza, and M. Isik, “Toxicity and intermediates of C.I. Direct Red 28 dye through sequential anaerobic/aerobic treatment”. *Process Biochemistry*, vol. 40, pp. 2735–2744, 2005.
 30. E. V. C. Rosa, T. M. Giuradelli, A. X. R. Corrêa, et al., “Ecotoxicological evaluation of the short term effects of fresh and stabilized textile sludges before application in forest soil restoration”. *Environmental Pollution*, vol. 146, pp.463–469, 2007.
 31. A. Villegas-Navarro, M. C. Romero González, E. Rosas López, R. Domínguez Aguilar, and W. Sachetin Marçal, “Evaluation of *Daphnia magna* as an indicator of toxicity and treatment efficacy of textile wastewaters”. *Environment International*, vol. 25, no. 5, pp. 619–624, 1999.
 32. A. Soetaert, T. Vandenbrouck, K. van der Ven, et al., “Molecular responses during cadmium-induced stress in *Daphnia magna*: Integration of differential gene expression with higher-level effects”. *Aquatic Toxicology*, vol. 83, pp. 212–222, 2007.
 33. V. M. A. S. Grinevicius, R. Geremias, R. Laus, et al., “Textile effluents induce biomarkers of acute toxicity, oxidative stress, and genotoxicity”. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 57, pp. 307–314, 2009.
 34. S. Chatterjee, M. Lee, and S. H. Woo, “Influence of impregnation of chitosan beads with cetyltrimethylammoniumbromide on their structure and adsorption of congo red from aqueous solutions”. *Chemical Engineering Journal*, vol. 155, pp. 254–259, 2009.
 35. N. R. Terra, I. R. Feiden, J. M. G. Fachel, C. T. Lemos, and E. A. Nunes, “Ecotoxicological evaluation of sediment and water samples from Sinos River, Rio Grande do Sul, Brazil, using *Daphnia magna* and V79 cells”. *Acta Limnologica Brasiliensia*, vol. 20, no. 1, pp. 63-72, 2008.
 36. N. L. Cooper, J. R. Bidwell, and A. Kumar, “Toxicity of copper, lead, and zinc mixtures to *Ceriodaphnia dubia* and *Daphnia carinata*”. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 72, no. 5, pp. 1523-1528, 2009.
 37. L. Lambolez, P. Vasseur, J. F. Ferard, and T. Gisbert, “The environmental risks of industrial waste disposal: an experimental approach including acute and chronic toxicity studies”. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 28, pp. 317–328, 1994.

38. S.-W., Kang, J. Seo, J. Han, J.-S. Lee, and J. Jung, "A comparative study of toxicity identification using *Daphnia magna* and *Tigriopus japonicus*: Implications of establishing effluent discharge limits in Korea". *Marine Pollution Bulletin*, vol. 63, no. 5-12, pp. 370-375, 2011.
39. I. Komjarova, and R. Blust, "Multi-metal interactions between Cd, Cu, Ni, Pb and Zn in water flea *Daphnia magna*, a stable isotope experiment". *Aquatic Toxicology*, vol. 90, no. 2, pp. 138-44, 2008.
40. V. Tsiridis, M. Petala, P. Samaras, S. Hadjispyrou, G. Sakellaropoulos, and A. Kungolos, A., "Interactive toxic effects of heavy metals and humic acids on *Vibrio fischeri*". *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 63, no. 1, pp. 158-67, 2006.
41. A. Picado, E. Mendonça, L. Silva, et al., "Ecotoxicological assessment of industrial wastewaters in Trancão River Basin (Portugal)". *Environmental Toxicology*, vol. 23, no.4, pp. 423-560, 2008.
42. S. J. Hamilton, K. M. Holley, K. J. Buhl, and F. A. Bullard, "Selenium impacts on razorback sucker, Colorado: Colorado River III. Larvae". *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 61, no. 2, pp. 168-189, 2005.
43. A. Kostamo, and J. V. K. Kukkonen, "Removal of resin and sterols from pulp mill effluents by activated sludge treatment". *Water Research*, vol. 37, pp. 2813-2820, 2003.
44. D. P. Middaugh, N. Beckham, J. W. Fournie, and T. L. Deardorff, "Evaluation of bleached kraft mill process water using Microtox, *Ceriodaphnia dubia*, and *Menidia beryllina* toxicity tests". *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 32, pp. 367-375, 1997.
45. M. G. Dube, and J. M. Culp, "Growth responses of periphyton and chironomids exposed to biologically treated bleached kraft pulp mill effluent". *Water Science and Technology*, vol. 35, no. 2-3, pp. 339-345, 1997.
46. H. C. Sarakinos, and J. B. Rasmussen, "Use of bioassay-based whole effluent toxicity (WET) tests to predict benthic community response to a complex industrial effluent". *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*, vol. 6, pp. 141-157, 1998.
47. J. I. Seco, C. Fernández-Pereira, and J. Vale, "A study of the leachate toxicity of metal-containing solid wastes using *Daphnia magna*". *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 56, pp. 339-350, 2003.

48. M. A. R. Silva, R. C. Testolin, A. P. Godinho-Castro, A. X. R. Corrêa, and C. M. Radetski, “Environmental impact of industrial sludge stabilization/solidification products: chemical or ecotoxicological hazard evaluation?” *Journal of Hazardous Materials*, vol. 192, no. 3, pp.1108-1113, 2011.
49. W. M. de Coen, and C. R. Janssen, “The use of bio markers in *Daphnia magna* toxicity testing. Digestive enzyme activity in *Daphnia magna* exposed to sublethal concentrations of cadmium, chromium and mercury”. *Chemosphere*, vol. 35, no. 5, pp. 1053–1067, 1997.
50. K. A. C. de Schamphelaere, I. de Forrez, K. Dierckens, P. Sorgeloos, and C. R. Janssen, “Chronic toxicity of dietary copper to *Daphnia magna*”. *Aquatic Toxicology*, vol. 81, pp. 409–418, 2007.
51. C. Xavier, S. Chamorro, and G. Vidal, “Chronic effects of kraft mill effluents and endocrine active chemicals on *Daphnia magna*”. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, vol.75, pp. 670–676, 2005.
52. E. Mendonça, M. A. Cunha, A. Picado, et al., “Avaliação directa da toxicidade de águas residuais: um caso de estudo”. *Recursos Hídricos*, vol. 28, no. 1, pp.84-93, 2008.

List of Tables

TABLE 1 - Characteristics of industrial solid waste samples collected at the entrance of an industrial an sanitary landfill, as classified according to NBR 10004 (ABNT, 2004c).

TABLE 2 - Results of *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri* acute toxicity tests after exposition to soluble fraction of textile, metal-mechanic and pulp and paper industrial solid waste.

TABLE 3 - Effects on reproduction, longevity and growth of *Daphnia magna* exposed to soluble fractions of textile wastes, samples TX1, TX2, TX3 and TX4, during 21 days. Results are expressed as means \pm standard deviation.

TABLE 4 - Effects on reproduction, longevity and growth of *Daphnia magna* exposed to soluble fractions of metal-mechanic waste, samples MM1, MM2 and MM3, during 21 days. Results are expressed as means \pm standard deviation.

TABLE 5 - Effects on reproduction, longevity and growth of *Daphnia magna* exposed to soluble fractions of pulp and paper mill waste, samples PP1, PP2 and PP3, during 21 days. Results are expressed as means \pm standard deviation.

TABLE 6 - Summary of acute effects on *Vibrio fischeri* and *Daphnia magna* and chronic effects (reproduction, longevity and growth) in *Daphnia magna* exposed to soluble fractions of textile, metal-mechanic and pulp and paper solid waste.

TABLE 1

Parameters Analyzed (mean values)	Industrial Waste Description ^a					
	Sludge from textile treatment plant. Class II A		Sludge from metal-mechanic treatment plant. Class II A		Sludge from pulp and treatment paper plant. Class II A	
	Samples TX1, TX2, TX3 and TX4		Samples MM1, MM2 and MM3		Samples PP1, PP2 and PP3	
	Dry weight (mg/kg)	Soluble fraction (mg/L)	Dry weight (mg/kg)	Soluble fraction (mg/L)	Dry weight (mg/kg)	Soluble fraction (mg/L)
Al	-	-	ND	-	-	-
As	38.77	ND	ND	ND	49.53	0.004
Ba	-	12.72	ND	ND	-	0.72
Cd	4.73	0.05	ND	ND	-	0.04
Pb	155.77	0.72	4.6	0.24	709.87	0.59
Cyanides	47.07	-	ND	-	-	-
Chlorides	-	-	939.5	-	-	-
Cu	-	-	ND	ND	-	-
Cr _{total}	50.59	1.46	228.58	0.25	98.98	0.07
Phenol	4.61	-	8.73	-	1.2	-
Fe	-	0.05	39631.8	-	-	-
Mg	-	-	240.34	-	-	-
Mn	-	-	148.3	-	-	-
Hg	ND	ND	ND	ND	0.09	0.0001
Ni	-	-	0.63	0.13	-	-
Oil and greases	-	-	0.08	-	-	-
Ag	-	-	ND	ND	-	0.03
Se	9.2	0.15	ND	ND	4.67	0.05
Zn	-	0.1	639.22	1.45	-	-

(^a) NBR 10004 Classification Report submitted to the industrial and sanitary landfill, by industries responsible for waste.

(-) Not analyzed.

(ND) Not detected.

TABLE 2

Industry	Sample	<i>Daphnia magna</i> CE _{50, 48h} (%)	<i>Vibrio fischeri</i> CE _{50, 30min} (%)	pH	OD (mg/L)
Textile	TX1	70.71	> 100	6.83	2.9
	TX2	> 100	43.77	7.75	5.8
	TX3	11.26	12.08	7.71	4
	TX4	48.29	17.99	6.9	3.2
Metal- mechanic	MM1	84.86	73.86	8.89	4.3
	MM2	70.71	48.73	9.47	4.7
	MM3	2.21	17.47	6.9	5.8
Pulp and Paper	PP1	> 100	91.93	6.72	4.1
	PP2	> 100	19.0 ^a	8.17	5.6
	PP3	51.76	18.61	6.3	3.4

(^a) Determined by data extrapolation.

TABLE 3

Sample	Concentration (%)	Reproduction: n° neonates/ broods	Longevity: n° survivors	Growth: lenght (mm)
TX1	Control	21.9 ± 4.17	10 ± 0.0	4.3 ± 0.48
	6.25	24.6 ± 4.33	8 ± 0.42	4.57 ± 0.42
	12.5	27.91 ± 3.05	9 ± 0.32	4.71 ± 0.29
	25	26.7 ± 5.90	9 ± 0.32	4.75 ± 0.39
	50	26.24 ± 4.30	7 ± 0.48	4.6 ± 0.19
TX2	Control	21.9 ± 4.17	10 ± 0.0	4.25 ± 0.42
	3.125	19.14 ± 3.67	9 ± 0.32	4.44 ± 0.42
	6.25	30.09 ± 5.45	10 ± 0.0	4.92 ± 0.20 ^a
	12.5	33.56 ± 11.78 ^a	1 ± 0.32 ^a	4.44 ± 0.39
	25	38.98 ± 5.25 ^a	0.0 ± 0.0 ^a	4.6 ± 0.42
TX3	Control	19.11 ± 2.54	10 ± 0.0	3.9 ± 0.21
	0.78	25.32 ± 4.51 ^a	10 ± 0.0	3.77 ± 0.36
	1.56	30.91 ± 3.71 ^a	9 ± 0.32	4.06 ± 0.32
	3.125	31.16 ± 7.11 ^a	9 ± 0.32	3.87 ± 0.35
	6.25	38.14 ± 5.18 ^a	7 ± 0.48	4.0 ± 0.0
TX4	Control	20.66 ± 3.03	10 ± 0.0	4.75 ± 0.35
	1.56	23.64 ± 3.92	7 ± 0.48	4.75 ± 0.42
	3.125	22.72 ± 7.22	6 ± 0.52	4.92 ± 0.19
	6.25	23.67 ± 7.84	6 ± 0.52	4.83 ± 0.25
	12.5	16.8 ± 3.27	4 ± 0.52 ^a	4.66 ± 0.41

(^a)Values which differ significantly from control (P < 0.05).

TABLE 4

Sample	Concentration (%)	Reproduction: n° neonates/ broods	Longevity: n° survivors	Growth: lenght (mm)
MM1	Control	18.98 ± 2.58	10 ± 0.0	3.7 ± 0.48
	0.52	22.45 ± 3.29	9 ± 0.32	3.83 ± 0.41
	0.78	20.09 ± 4.69	8 ± 0.42	3.87 ± 0.35
	1.04	24.53 ± 3.96 ^a	9 ± 0.32	4 ± 0.0
	1.56	23.77 ± 4.34 ^a	10 ± 0.0	4 ± 0.0
MM2	Control	15.34 ± 3.30	10 ± 0.0	3.95 ± 0.16
	6.25	16.37 ± 3.65	10 ± 0.0	3.8 ± 0.26
	12.5	20.11 ± 5.19	10 ± 0.0	3.85 ± 0.24
	25	27.49 ± 9.31 ^a	10 ± 0.0	3.9 ± 0.21
	50	2.66 ± 2.08 ^a	10 ± 0.0	3.65 ± 0.34 ^a
MM3	Control	16.23 ± 2.58	10 ± 0.0	3.85 ± 0.24
	0.52	20.41 ± 3.41 ^a	9 ± 0.32	3.93 ± 0.19
	0.78	22.18 ± 2.98 ^a	8 ± 0.42	3.94 ± 0.32
	1.04	27.56 ± 1.99 ^a	10 ± 0.0	3.94 ± 0.17
	1.56	26.21 ± 2.77 ^a	9 ± 0.32	4.21 ± 0.27 ^a

(^a)Values which differ significantly from control (P < 0.05).

TABLE 5

Sample	Concentration (%)	Reproduction: n° neonates/ broods	Longevity: n° survivors	Growth: length (mm)
PP1	Control	19.57 ± 2.70	10 ± 0.0	4.1 ± 0.21
	12.5	33.27 ± 5.15 ^a	9 ± 0.32	3.94 ± 0.30
	25	28.96 ± 6.15 ^a	10 ± 0.0	3.9 ± 0.32
	50	29.32 ± 6.57 ^a	10 ± 0.0	4.06 ± 0.42
	100	24.34 ± 9.10	3 ± 0.48 ^a	3.08 ± 0.49 ^a
PP2	Control	19.49 ± 3.89	10 ± 0.0	4.8 ± 0.42
	12.5	26.43 ± 3.22 ^a	10 ± 0.0	4.9 ± 0.32
	25	24.84 ± 3.03 ^a	10 ± 0.0	4.66 ± 0.71
	50	24.22 ± 4.76 ^a	10 ± 0.0	4.9 ± 0.32
	100	5.78 ± 4.67 ^a	4 ± 0.52 ^a	4.25 ± 0.96 ^a
PP3	Control	9.20 ± 1.74	10 ± 0.0	4.2 ± 0.26
	6.25	5.49 ± 1.92 ^a	10 ± 0.0	2.95 ± 0.28 ^a
	12.5	8.13 ± 2.60	10 ± 0.0	2.8 ± 0.35 ^a
	25	6.81 ± 3.50	10 ± 0.0	2.55 ± 0.44 ^a
	50	1.50 ± 0.71 ^a	0 ± 0.0 ^a	2.75 ± 0.35 ^a

(^a) Values which differ significantly from control (P < 0.05)

TABLE 6

Industry	Sample	<i>V. fischeri</i>	<i>D. magna</i>	<i>D. magna</i> Reproduction effects	<i>D. magna</i> Longevity effects	<i>D. magna</i> Growth effects
		CE ₅₀ , 30min (%)	CE ₅₀ , 48h (%)			
Textile	TX1	NT	70.71	NO	NO	NO
	TX2	43.77	NT	O	O	O
	TX3	12.08	11.26	O	NO	NO
	TX4	17.99	48.29	NO	O	NO
Metal- mechanic	MM1	73.86	84.86	O	NO	NO
	MM2	48.73	70.71	O	NO	O
	MM3	17.47	2.21	O	NO	O
Pulp and Paper	PP1	91.93	NT	O	O	O
	PP2	19.0 ^a	NT	O	O	O
	PP3	18.61	51.76	O	O	O

(^a) Determined by data extrapolation.

(NT) Non Toxic.

(O) Observed.

(NO) Not Observed.

A10. ARTIGO 2

Effects of exposure to soluble fraction of industrial solid waste on lipid peroxidation and DNA methylation in erythrocytes of *Oreochromis niloticus*, as assessed by quantification of MDA and m⁵dC rates.

Este artigo foi publicado na Revista Científica *Environmental Toxicology and Safety*, n. 76, p. 63-70, 2012.

Letícia Flohr^a, Cristiane Funghetto Fuzinato^a, Sílvia Pedroso Melegari^a and William Gerson Matias^{a,*}

^aLaboratório de Toxicologia Ambiental, LABTOX, Depto. de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário, CEP: 88040-970, Florianópolis, SC, Brasil.

*Corresponding author: Prof. William Gerson Matias at Laboratório de Toxicologia Ambiental, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário, Caixa Postal 476, CEP 88.010-970, Florianópolis, SC, Brasil. Telephone number: + 55 48 3721-7742; Fax number: +55 48 3721-9823. E-mail address: will@ens.ufsc.br

Abstract

In this study, lipid peroxidation and DNA methylation were observed in erythrocytes of *Oreochromis niloticus* exposed to soluble fractions of textile, metal-mechanic and pulp and paper industrial waste, after a period of 48 hours. Lipid peroxidation was quantified by the rate of malondialdehyde (MDA) and DNA methylation was quantified by the rate of 5-methyldeoxycytosine (m⁵dC). Soluble fractions of textile industrial waste caused metabolic changes for all studied samples. In organisms exposed to samples TX1 and TX2 (textile waste) MDA rates were 132.36 and 140.28 nM MDA /mg protein, respectively, while in control organism the MDA rates were 27.5 nM MDA /mg protein. All samples from soluble fractions of textile industrial waste induced increases in m⁵dC rates, increases varied between 300 and 700% when compared to the control organism. All the organisms exposed to soluble fractions of metal-mechanic industrial waste presented increases between 360 and 600% in the rates of MDA, and one of them (sample

MM3) induced an increase of 180% in the rate of m⁵dC, when compared to control. Although a significant increase was not observed in the MDA rate of fish exposed to the soluble fractions of pulp and paper industrial waste, there was an increase of 460% in the rate of m⁵dC in one of the samples (sample PP2), when compared to control. The results showed that the soluble fractions of these industrial wastes are capable of inducing oxidative damage and altering the DNA methylation of *Oreochromis niloticus*. Thus, the MDA and m⁵dC rates demonstrated to be effective biomarkers of exposure, which could be used to evaluate the toxicity of soluble fractions of industrial solid waste.

Keywords: Lipid peroxidation, DNA methylation, industrial solid waste, *Oreochromis niloticus*.

Abbreviations: dC: deoxycytosine; m⁵dC : 5-methyldeoxycytosine; MDA: malondialdehyde.

1.Introduction

Santa Catarina is a *state* in southern Brazil which has a strong industrial activity, and sectors like textile, metal-mechanic, and pulp and paper are relevant to the local economy (FIESC, 2010). Industrial activity in these sectors generates solid waste and effluents with toxic potential. This, coupled with the lack of initiatives to protect the environment increases the risk of environmental problems, especially in water bodies that receive untreated industrial effluent or leachate from improperly disposed industrial waste. Effluents and industrial solid waste are complex mixtures, composed mainly of heavy metal, trace elements, dioxins, furans, phenols, chlorides and cyanides (Ali and Sreekrishnan, 2001; Sisinno, 2003). The mere presence of a contaminant in the aquatic environment is not indicative of adverse effects due to the synergism between molecules and chemical interactions with the organisms, and an assessment of complex mixtures without an ecotoxicological characterization is not adequate to predict the potential effects on the environment (Van der Oost et al., 2003; Picado et al., 2008). Thus, the study of water pollution can be performed on fish, since these organisms can accumulate pollutants through contact with chemicals present in water or by eating organisms that accumulate pollutants (Al-Sabti, 1995; Hanson and Larsson, 2011). In fish, the effects of exposure to pollutants can be measured by using biomarkers such as malondialdehyde (MDA), which indicates the process of lipid

peroxidation (Bacchetta et al., 2010; Garcia-Medina et al., 2010) and 5-methyldeoxycytosine (m^5dC), which indicates changes in DNA methylation (Shugart, 1990, 2000; Aniagu et al., 2008).

Lipid peroxidation can be described as a degenerative process, generated by an oxidative stress that causes damage to the function of cell membranes, such as a change in their integrity and an increase of their permeability (Storey, 1996; Girotti, 1998; Matias and Creppy, 1998a). The whole body can suffer consequences because of injuries in the cell membrane generated by the oxidizing attacks on lipids, fatty acids and cholesterol (Gabrielak et al., 2002; Uz-Zaman et al., 2008). The phospholipase, activated by toxic substances disintegrates the phospholipids and releases unsaturated fatty acids (Halliwell and Gutteridge, 1989), resulting in harmful effects of lipid peroxides and among other effects, changes in DNA. The malondialdehyde (MDA), a product generated in the lipid peroxidation, is strongly related to proteins damage (Traverso et al., 2004; Suji and Sivakami, 2008). In aquatic organisms, the lipid peroxidation is induced through exposure to toxic agents such as industrial effluents, metals and pesticides (Ahmad et al., 2000; Oakes and Van der Kraak, 2003; Avci et al., 2005; Üner et al., 2006; Almeida et al., 2007).

DNA methylation is linked to DNA transcription and to activation and inactivation of genes. It is controlled by enzymes methyltransferase that add or remove methyl groups to the 5 position of cytosine. In animal cells, 2-7% of cytosines are methylated (Robertson, 2001; Lewin, 2004). These changes are crucial to the development and maintenance of cell functions (Pogribny and Beland, 2009). However, studies suggest that abnormal methylation is mainly related to carcinogenesis (Matias and Creppy, 1998b; Aniagu et al., 2008): hypermethylation is associated with the inactivation of tumor suppressor genes (Esteller, 2003) while hypomethylation is associated with the expression of oncogenes (Pfohl-Leszkowicz et al., 1984). When DNA methylation is perpetuated through generations, resulting in changes of gene expression without changes in DNA sequences, it can be recognized as epigenetic alteration (Lewin, 2004). In aquatic organisms like microcrustaceans, fish and amphibians, environmental pollutants can affect the DNA methylation (Huang et al., 2007; Vandegheuchte et al., 2009; Wang et al., 2009).

Due to the risk that soluble fractions of industrial solid waste present to aquatic organisms, the aim of this study was to evaluate the lipid peroxidation by quantifying MDA rates and to verify DNA methylation by quantifying m^5dC rates in *Oreochromis niloticus*

exposed to soluble fractions of three types of industrial wastes, and also to verify if these methods are suitable for the proposed situation. It is demonstrated that *O. niloticus* is suitable as a bioindicator of genotoxic effects caused by contaminants presented in water (Çavas and Ergene-Gozükkara, 2003; Grisolia et al., 2009; Franco et al., 2010).

2. Materials and methods

2.1 Test organisms

Oreochromis niloticus fish (weight = 30.6 ± 0.3 g, length = 11 ± 2 cm) were acclimated for a period of 15 days in 130 liter tanks with aerated and chlorine-free water, with diffuse light (photoperiod of 16 hours) and at $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ temperature. The organisms were fed every 48 hours with food for juvenile fish (Peixe Juvenil, Acqua Line, Supra, RS, Brazil) containing 42% protein and 500 mg/kg vitamin C. The remains of uneaten food and fecal material were removed from storage tanks and the water was renewed every 48 hours.

2.2 Waste sampling

The field sampling was performed according to the procedures of NBR 10007 (ABNT, 2004a). The laboratory sampling was based on the Leaching Flowchart - Appendix B of NBR 10005 (ABNT, 2004b). Ten samples of waste were collected at the entrance of the Industrial and Sanitary Landfill of Blumenau (Blumenau, SC - Brazil). The wastes were characterized, according to NBR 10004 (ABNT, 2004c), as sludge from the treatment plant of the following industries: textile, metal-mechanic, and pulp and paper (Table 1). Several studies have investigated the physical and chemical characteristics of industrial waste (Chen et al., 2001; Jha et al., 2001; Kostamo and Kukkonen, 2003; Chandra et al., 2005; Rosa et al., 2007), and the general composition of the waste collected for this study is also described in Table 1.

2.3 Soluble fraction of industrial waste samples preparation

Samples preparation were based on NBR 10005 (ABNT, 2004b), with modifications. 100 g of raw sample were introduced in a bottle which was filled with 2.0L of distilled water. The bottle was kept under shaking for 18 hours with a rotation of 30 rpm in a rotary shaker. After shaking, the samples had their pH and dissolved oxygen measured according to the methodology described in Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (APHA, 1995). Samples of soluble fractions (leached) were exposed to the test organisms and lipid peroxidation and DNA methylation rates were measured.

2.4 Fish Exposure Assays

Each fish was kept in an individual two liter aquarium under aeration, and they were exposed to soluble fractions of industrial waste during periods of 48 hours, according to the following concentrations (Table 2). These concentrations were employed in order to limit and minimize the use of organisms in preliminary tests to define the lethal concentration for each sample. So, the concentrations were adapted according to Çavas and Ergene-Gözüçara (2003), Mishra and Mohanty (2008) and Wahbi et al. (2004), based on the characteristics of each substance, the species, weight and size of the test organisms. Negative control and positive control were also performed with only one body for the same reason, to limit and minimize the amount of organisms used in the experiment. One organism exposed to the water of the acclimatization tank was used for the negative control, while one organism exposed to a concentration of 2.5mg/L of potassium dichromate (sublethal concentration of $K_2Cr_2O_7$ adapted to body weight, based on Mishra and Mohanty, 2008) was used as a positive control.

Concentrations of soluble fractions of textile waste samples (6.25, 12.5 and 25.0%) were adapted from Çavas and Ergene-Gözüçara (2003), who observed genotoxic effects in *O. niloticus* (weight: $30 \pm 5.5g$ and size: 9.5 ± 1.5 cm) exposed to textile effluents. In this study, concentrations of 5.0, 10.0 and 20.0% induced the formation of micronuclei and abnormalities in the nucleus of the organisms' erythrocytes. As the soluble fraction of waste cannot be compared with the raw effluent, we decided to increase the exposure concentrations of the solubilized samples, since the concentration of toxic substances is probably smaller. Since four samples of textile waste were collected in this study (samples TX1, TX2, TX3 and TX4), the sample dilutions values were distributed randomly.

Waste from the metal-mechanic industry contains large amounts of chromium in its composition (Chandra et al., 2005; Jha et al., 2001). Thus, we used an adaptation of the concentrations used by Mishra and Mohanti (2008), who observed that *Chana punctatus* fish (weighing 50-55g, size: 18-20cm) exposed to concentrations of 20 mg/L and 40mg/L showed abnormal behavior, changes in swimming and loss of balance. Thus, we decided to use a 25.0% dilution of the soluble fraction of metal-mechanic industrial waste of samples MM1 and MM2 to observe the effects in *Oreochromis niloticus*. Sample MM3 was characterized as electroplating waste, so we looked for a reference dilution for this specific waste type. Chen et al. (2001) affirm that in addition to chrome and nickel, electroplating wastewater usually contains cyanide, and the

interaction of these substances may contribute significantly to the effluent toxicity. The same researchers reported a $CL_{50,96h}$ of 11.5% in young *Oreochromis mossambicus* (2-3 months old) exposed to an electroplating effluent. In the present work, in order to guarantee the survival of the organism during the 48 hours of exposure, a 6.25% dilution of the soluble fraction was used for the sample MM3.

In samples of pulp and paper waste (PP1, PP2 and PP3), the soluble fractions were diluted at 25.0%. According to Wahbi et al. (2004), *Lithognathus mormyrus* (average weight: 99g, medium size: 15cm) showed significant decreases in the amount of protein in muscle and gonads when they were exposed to a 20ml/L concentration from a pulp and paper effluent.

During exposure, the fish were kept under diffuse light (photoperiod of 16 hours), at $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ temperature, and without food. The fish erythrocytes were collected by puncture of caudal vein and preserved in 0.5 mL of EDTA anticoagulant. The collected erythrocytes were separated in 200 μL aliquots. For each individual two replicates were made. The collected aliquots were used for determination of MDA and m^5dC rates.

2.5 DNA methylation measured by m^5dC rates.

DNA methylation was carried out based on previous work (Bardakci and Sibinski, 1994; Matias and Creppy, 1998b), with some modifications. 200 μL of blood were centrifuged and the pellet formed was resuspended with 400 mL of lysis buffer (1M Tris HCl pH 7.4, 1M NaCl, 0.5 M EDTA pH 8, 10% SDS, MiliQ water). 10 μL of Proteinase K were added and the samples were left in a water bath at 45°C for 2 hours. Subsequently, the DNA was purified with one extraction with phenol, one extraction with phenol:chloroform and one extraction with chloroform. DNA was precipitated with cold isopropanol and incubated at 20°C overnight. Then, DNA was washed with 500 mL of ethanol 70%, and after drying, the pellet was resuspended in 50 μL of MiliQ water. 5 μL RNase was added and left at room temperature overnight. DNA purity was quantified by the ratio between the absorbance at 260 and 280nm. The A_{260}/A_{280} nm ratio should be between 1.8 and 2.0 to ensure a high level of DNA purity. DNA was preserved at -20°C and a volume containing 20 μg of pure DNA of each sample was lyophilized. The first enzymatic hydrolysis occurred when the lyophilized DNA was dissolved in ultrapure water, followed by a quick ice bath and a water bath at 100°C , and the subsequently addition of 2 μL of potassium acetate 250mM (pH 5.4), 2 μL of zinc sulfate 10 mM and 4 μL of P1

nuclease (6.25 U/mL). The tubes were incubated at 37°C overnight. A second hydrolysis was carried out after adding 4µL of Tris-HCl (pH 8.3) and 4µL of alkaline phosphatase (0.31 U/mL). The tubes were shaken for two hours at 37°C. After the incubation, 25µL of chloroform were added to each sample to inactivate the enzymes used in hydrolysis. The tubes were centrifuged at 13000g for 10 minutes. The quantification of m⁵dC was performed by HPLC (HP1050 HPLC System) and an UV detector (HP1050 Series Variable Wavelength Detector), using an Agilent Zorbax SB-Phenyl column (250 x 4.6 mm, 5µm). Elution was carried out with H₂PO₄ (NH₄) 6.5 mM at pH 3.95 and 4% methanol (v/v) at a flow rate of 1.0 mL/min. The injection volume was 20µL of a dilution of 1/10 of the hydrolyzed DNA. Eluates were monitored at 254nm. Standard DNA bases (dC and m⁵dC – Sigma-Aldrich) were used for quantification. The results in µg/mL were used to calculate the % rate of m⁵dC as compared to (m⁵dC + dC) * 100.

2.6 Lipid peroxidation measured by MDA quantification

The analytical method for MDA quantification was performed according to Matias and Creppy (1998a), with modifications. Centrifugation of 200µL aliquots of fish erythrocytes were carried at 2000g for 10 minutes, and the plasma obtained were used for the test. 100µL of plasma were collected from each sample and then, 150µL of SET buffer, pH 8 were added. The samples were shaken in a Vortex and 20µL of the homogenate were removed to measure the protein content. A calibration curve was prepared with eight samples of standard MDA concentrations varying between 7.5 and 6x10⁷ nM. The following reagents were added to the standard MDA concentrations and to the plasma samples: 25µL SDS 7% (w/v), 300µL HCl 0.1M, 40µL phosphotungstic acid 1% (w/v) and 300µL thiobarbituric acid 0.67% (w/v). After Vortex mixing, the tubes were incubated at 90°C for 1 hour in the dark, and then cooled in ice bath (0°C) for 15 minutes. Subsequently, a volume of 300µL of n-butanol were added to each sample and the tubes were vigorously mixed in a Vortex. Then a centrifugation was carried at 3000g for 10 minutes. The n-butanol phase containing the MDA-TBA adduct was separated and quantified through HPLC (HP1050 HPLC System) with a Suplecasil LC-18 column (250 x 4.6 mm, 5µm). The mobile phase consisted of methanol–water 40:60 (v/v), pH 8.4. The flow rate was kept at 0.5 mL/min, and the injection volume was 50µL. The excitation and emission wavelengths were of 515 and 553 nm, respectively (Programmable Fluorescence Detector HP 1064A). The amount of MDA-TBA quantified is related to the protein

content of cellular homogenates, determined using the colorimetric Bradford method (1976).

2.7 Statistical analysis

Statistical analysis was performed with mean values from two replicates of each sample \pm standard deviation. Due to the small amount of data, the results were analyzed by industrial waste type, using Dunnett tests (Dunnett, 1955), through the Dunnett Program version 1.5 (U.S.EPA, 1999). A significance level of $p < 0.05$ was accepted.

3. Results

3.1 pH and Dissolved Oxygen

In all raw samples of soluble fractions of industrial waste pH values varied between 6.3 and 9.47 and dissolved oxygen varied between 2.9 and 5.8 mg/L (Table 3).

3.2 Lipid peroxidation: MDA quantification.

After 48h of exposure, the negative control organism produced 27.05 ± 8.32 nM MDA/mg of protein, and the positive control (organism exposed to 2.5mg/L of potassium dichromate) produced 168.09 ± 58.15 nM MDA/mg of protein (Table 4). The value found for the positive control was significantly higher compared to the negative control.

Soluble fractions of textile industrial wastes induced very similar values of MDA rates between samples TX1 and TX2 and between samples TX3 and TX4. The MDA rate increased approximately 400% for samples TX1 and TX2, and 77.5% and 48.5% for samples TX3 and TX4 respectively, when compared to the negative control.

Soluble fractions of metal-mechanic industrial wastes induced significant increases in the rate of MDA, when compared to the negative control. The production of MDA increased 393.53% and 363.36% for samples MM1 and MM3, and 602.48% for sample MM2.

Among the organisms exposed to the soluble fractions of pulp and paper industrial wastes, the increases of MDA rates observed were not significant. Sample PP1 induced an increase in MDA rate of 106.17% when compared to the negative control. Samples PP2 and PP3 induced increases in the MDA rates of 66.1% and 5.58% respectively, when compared to the negative control.

3.3 DNA methylation measured by m^5dC rates.

After 48h of exposition, negative control organism spontaneously produced $3.82 \pm 0.09\%$ of m^5dC . Potassium dichromate (2.5 mg/L) employed as positive control increased the m^5dC rates to $9.99 \pm 2.23\%$.

5-methyldeoxycytosine quantification in fish erythrocytes exposed to the soluble fractions of textile industrial wastes indicates a significant increase of methylation in all samples (Fig. 1). Samples TX1, TX2 and TX3 induced an increase of m^5dC rates of approximately 300% when compared to the negative control. Organisms exposed to samples TX1, TX2 and TX3, produced m^5dC rates of $15.49 \pm 0.59\%$, $14.01 \pm 3.69\%$ and $15.84 \pm 0.73\%$, respectively. The organism exposed to sample TX4 produced a m^5dC rate of $30.91 \pm 0.77\%$, which means an increase of 722.93% when compared to the negative control.

Among the fish exposed to the soluble fraction of metal-mechanic industrial waste, there was a significant increase induced by sample MM3 (Fig. 1). Organisms exposed to sample MM3 produced m^5dC rate of $10.64 \pm 2.21\%$, which corresponds to an increase of 183.24% when compared to the negative control. In the organism exposed to sample MM2 the increase was of 59.63%, when compared to control. The m^5dC rate produced by this organism was of $6.0 \pm 3.16\%$. Sample MM1 was the only one that induced decreases in m^5dC rates. The m^5dC rate produced was of $1.01 \pm 0.42\%$, which means a decrease of 73.21% when compared to the negative control.

The production of m^5dC increased in all of the *Oreochromis niloticus* exposed to the soluble fractions of pulp and paper industrial waste, when compared to the negative control (Fig.1). Organisms exposed to samples PP1 and PP3 produced m^5dC rates of 14.59% and $14.00 \pm 10.78\%$ respectively. These values indicate increases of 288.49 and 272.63% in m^5dC rates, when compared to the negative control. In the organism exposed to sample PP2 the increase was significant, 471.52% compared to control. The m^5dC rate produced was of $21.47 \pm 2.08\%$.

4. Discussion

Industrial solid wastes are complex mixtures composed of various toxic substances that can bioaccumulate in organisms and reach humans through the food chain (Sisinno, 2003). Even if each one of these compounds is present in low concentrations, synergic and additive effects can potentiate the toxicity of mixtures that affect aquatic

organisms (Schwarzenbach et al., 2006; Baderna et al., 2011). Therefore, the substances present in environmental pollutants are capable of inducing oxidative damage and DNA damage, which can lead to epigenetic effects (Baccarelli and Bollati, 2009).

Results of this study indicate that soluble fractions of industrial solid waste induce increases in MDA rates of *Oreochromis niloticus* erythrocytes. Significant increases were induced by five samples. Although there are few studies reporting MDA rates in erythrocytes of fish exposed to industrial pollutants, there are several studies where MDA rates are reported in organs and tissues like kidneys, liver, gills and muscle. Uz-Zaman et al. (2008) analyzed the MDA rates in *Sophora Puntius* exposed to effluents from a textile industry and compared with the MDA rates of fish that were not exposed to the effluent. In liver tissue there was a significant increase of 65% in the rate of MDA, and in extrahepatic tissues there was an increase of almost 420%, when compared to the controls. The researchers related the increase in rates of MDA with a small reduction in cholesterol levels of fish exposed to the textile effluent, and claim that this exposure affected the plasma membranes (composed of cholesterol and fatty acids), because they may be vulnerable to physicochemical and physiological disruption of homeostasis. In our study, soluble fractions of textile industrial waste induced increases of up to 400% (compared with control) in the MDA rates of *O. niloticus*. These increases could be associated with the oxidation of cholesterol, which could have affected the integrity of the fish cell membranes, which explains the differences observed when compared to the negative control.

Industrial waste, primarily textiles and metal-mechanics, contains various types of metals (Table 1), and several studies confirm lipid peroxidation in fish erythrocytes and organs induced by metals. Garcia-Medina et al. (2010) suggest that increases in the MDA rates in *Cyprinus carpio* plasma are related to exposure to aluminum. The researchers observed increases of up to 529% in MDA rates of fish exposed for 48 hours to 120mg/L of aluminum, when compared to control group. Chronic exposure to metals also induces changes in MDA rates. Gopal et al. (2009) observed increases of 52.2 and 98.5% in the rates of MDA in gills, kidneys, liver and muscle of *Cirrhinus Mrigal* exposed to 3.5 mg/L of nickel for 28 days. Osman et al. (2009) observed increases of around 50% in MDA levels of these same organs in *Oreochromis niloticus* exposed to 15mg/L of cadmium for 15 days. Roberts and Oris (2004) observed a fivefold increase in the MDA rates of gills from *Oncorhynchus mykiss* exposed to 10.2mg/L of hexavalent

chromium for 48 hours. In addition to metals, other contaminants may be responsible for increases in MDA rates on fish. Avci et al. (2005) observed a significant increase around 115% in the MDA rates in muscles of *Silurus glanis* collected in a river that receives effluents from a petroleum refinery industry. A preliminary chemical characterization of the effluent was also done. The researchers related the muscle tissue oxidation with the presence of compounds such as ammonia nitrogen, oil and grease, sulfur and phenol in the effluent speculating that these compounds were responsible for damaging the antioxidant system.

Erythrocytes of fish exposed to soluble fractions from pulp and paper industrial waste did not show significant increases in rates of MDA. Oakes and Van der Kraak (2003) observed increases of 51.3 and 39.7% in the levels of MDA in liver of females and males of *Catostomus commersoni* collected in rivers receiving effluent from a pulp and paper industry, and these increases were not considered significant by the investigators. However, the researchers observed that fish exposed to these effluents had higher amounts of free iron, and this was related to the induction of oxidative stress. In another study, Oakes et al. (2003) observed increases in the rate of lipid peroxidation in liver and gonads of *Catostomus commersoni* collected in the same areas. Although the researchers were not able to relate these increases to changes in fish reproduction, the fact that these increases have been observed in tissues of reproductive organs alert to the danger of contamination by pulp and paper industrial waste on the aquatic ecosystem. In the present study, increases of MDA rates in fish erythrocytes indicate that there may have been a disturbance in lipid membranes of the exposed *O. niloticus* due to metals and other contaminants present in the soluble fraction of industrial wastes.

This study also demonstrates that the DNA methylation in erythrocytes of *Oreochromis niloticus* is altered by exposure to soluble fractions of industrial waste. There was significant DNA hypermethylation in erythrocytes of six fish exposed to the soluble fractions of industrial waste (samples TX1, TX2, TX3, TX4, MM3 and PP2). Metals present in these samples may have induced DNA methylation (Baccarelli and Bolatti, 2009). Li et al. (2009) observed DNA hypermethylation in *Danio rerio* embryos exposed to arsenite. After 48 hours of exposure to 2 mM of arsenite, the embryos showed a large increase in DNA methylation, especially in the tail. The arsenite is a derivative of arsenic and a powerful carcinogen, which can be released into the environment during various industrial processes (Sabo-Attwood et al., 2006). Zhang et al. (2009) observed hypermethylation in the liver

and kidney of chickens exposed to two concentrations of cadmium. The increase in methylation was significant in both organs analyzed, and the percentages of increase were between 60 and 180% in the liver, and between 10 and 20% in the kidneys. Cadmium is a heavy metal present in leachate from the metal-mechanic waste (Chandra et al., 2005), classified as a carcinogen by the National Institute for Environmental Health Sciences (NIEHS, 2011), and may induce genotoxic and epigenetic effects at the molecular level (Waalkes, 2003). In the mentioned studies, it is evident that the increases in DNA methylation are induced by chemicals. Similarly, in the present study it may be possible to relate hypermethylation with the chemicals present in the soluble fraction of industrial waste.

It is possible to relate the results observed in *O. niloticus* after exposition to the samples TX1, TX2, TX3, TX4, MM3 and the results observed in the positive control. Organisms exposed to these samples showed m⁵dC rates higher than that exposed to 2.5 mg/L of dichromate potassium. Chromium is present in the waste generated by these industries (Table 1), and this may explain the increases observed in m⁵dC rates.

Only one fish exposed to soluble fraction of industrial waste showed DNA hypomethylation (sample MM1). Huang et al. (2007), reported decreases in m⁵dC rates of 15.0, 7.5 and 5.5% in the liver of frogs collected from lakes receiving effluents from a petrochemical industry. Researchers related the amount of m⁵dC with the concentration of oil and phenols in water samples, and found that the higher the concentration of these substances in water, the greater the decrease in DNA methylation. Waste from the metal-mechanic industry may also contain oil and phenols in its composition, which results from the sludge stabilization process (Minocha et al., 2003). This could explain the decrease in m⁵dC rates observed in erythrocytes of fish exposed to sample MM1. The amount of decrease in DNA methylation observed in erythrocytes of *O. niloticus* exposed to sample MM1 (70% compared to control) resembles the higher value of the decrease in methylation reported by Wang et al. (2009). These researchers observed a decrease of 30 and 60% in DNA methylation in the liver of *Sebastiscus marmoratus* after exposition to different concentrations of tributyltin (TBT). There was also hypomethylation when organisms were exposed to trifenylytin (TPT), and this decrease was around 20%. They also investigated metabolic indicators of cellular methylation status, which are the substrate and the product of transmethylation reactions, respectively SAM (S-adenosylmethionine) and SAH (S-

adenosylhomocysteine), and concluded that TBT or TPT exposure caused DNA hypomethylation by altering the intracellular SAM and SAH concentrations. The researchers affirm that other sources of TBT and TPT are urban and industrial wastewater, sewage sludge, and leachate from landfills. According to Wilson et al. (2007), the hypomethylation, triggered by chemicals can predetermine the initiation of a tumor. Thus, it is important to note the m⁵dC rates induced by sample MM1. Even if the decrease in m⁵dC rate was not significant, the potential effects caused by the exposure to this sample must be considered, since hypomethylation may modify the concentrations of transmethylation reactions, which may lead to the initiation of a tumor.

Similar to sample MM1, samples MM2, PP1 and PP3 did not induce significant changes in the DNA methylation of *O. niloticus*. Aluru et al. (2010) reported increases of 20 and 30% in DNA methylation in liver of *Fundulus heteroclitus* living in an area contaminated with PCBs, a class of compound widely used in industrial applications, but these increases were not considered significant. The researchers relate these results with a chemical resistance, hereditarily acquired by fish living in the area. In a study using *Daphnia magna*, Vandegehuchte et al. (2009) reported that, despite chronic exposure to zinc, no significant DNA methylation was observed in the organisms of the F0 generation. However, it was noted that organisms of F1 generation showed a significant hypomethylation when compared to F0, and organisms of F2 generation showed a significant hypermethylation when compared to F0. DNA methylation is an epigenetic mechanism that can promote heritable changes in gene expression (Baccarelli and Bolatti, 2009), so, although exposure to soluble fraction of some industrial waste has not significantly altered DNA methylation, the genotoxic and epigenetic effects that may occur cannot be disregarded, since the abnormal methylation was observed.

Adverse factors such as temperature, oxygen level, salinity, exposure to metals, pesticides and oils and their derivatives are known to cause oxidative stress (Lushchak et al., 2010). Oxidative stress can damage DNA, thereby altering the methylation, which can result in carcinogenesis (Traore et al., 2000). By knowing that metals are present in industrial wastes and that lipid peroxidation results from an oxidative stress, causing mutations in DNA (Halliwell and Gutteridge, 1989), it is possible to find a link between lipid peroxidation and DNA methylation induced by soluble fractions of industrial wastes. These two processes may be evidenced jointly by the nature of the mechanisms that directly or indirectly affect the DNA, and can be used as markers of

environmental exposure for industrial solid waste. In our work, this link is evident in organisms exposed to samples TX1, TX2 and MM3, where significant increases both in MDA and in m⁵dC rates were reported. These results point to a potential deleterious effect on the regulatory system which may be related to oxidative processes, indicating a probable carcinogenic process in the exposed organisms. In organisms exposed to the other samples of soluble fractions of industrial wastes, the observed results do not permit to make this correlation, because although changes were observed, they were not considered significant.

5. Conclusion

The overall results show that soluble fractions of industrial wastes interfere with epigenetic systems. Although the substances that compose these wastes are well known in the physicochemical and toxicological level, studies on synergistic and antagonistic effects of complex mixtures are insufficient and need to be better explored. The fact that they cause deleterious effects to *Oreochromis niloticus* does not mean that extrapolation to other species can be direct, by contrast, these extrapolations are very complex to perform. However, the biomagnification of these elements in the food chain may be a factor that expresses effects in the human genome. This is a warning to the need for adequate treatment and disposal of industrial waste. Thus, the mechanisms of toxic action studied by the quantification of MDA and m⁵dC rates, prove to be biomarkers of exposure that can be used to evaluate the toxicity of soluble fractions of industrial solid waste.

Acknowledgments

This study was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES – Brazil) and by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – Brazil). We would like to thank Piscicultura Panamá, (Paulo Lopes – SC, Brazil), for providing the fish used in this study. We would like to thank Aterro Industrial e Sanitário de Blumenau (Blumenau – SC, Brazil), for providing samples of industrial waste that were used in this study. We would like to thank Flávia Azevedo for translating this paper into English.

References

ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas), 2004a. Amostragem de Resíduos Sólidos. NBR 10007. Rio de Janeiro, 21p.

ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas), 2004b. Resíduos sólidos – Procedimento para obtenção de extrato lixiviado de resíduos sólidos. NBR 10005. Rio de Janeiro, 16p.

ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas), 2004c. Resíduos sólidos – Classificação. NBR 10004. Rio de Janeiro, 71p.

Ahmad, I., Hamid, T., Fatima, M., Chand, H.S., Jain, S.K., Athar, M., Raisuddin, S., 2000. Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus* Bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure. *Biochim. Biophys. Acta.* 1523, 37-48.

Ali, M., Sreekrishnan, T.R., 2001. Aquatic toxicity from pulp and paper mill effluents: a review. *Adv. Environ. Res.* 5, 175-196.

Almeida, E.A., Bairy, A.C.D., Loureiro, A.P.M., Martinez, G.R., Miyamoto, S., Onuki, J., Barbosa, L.F., Garcia, C.C.M., Prado, F.M., Ronsein, G.E., Sigolo, C.A., Brochini, C.B., Martins, A.M.G., Medeiros, M.H.G., Di Mascio, P., 2007. Oxidative stress in *Perna perna* and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: Antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage. *Comp. Biochem. Physiol., A.* 146, 588-600.

Al-Sabti, K., 1995. An in vitro binucleated blocked hepatic cell technique for genotoxicity testing in fish. *Mutat. Res.* 335, 109-120.

Aluru, N., Karchner, S.I., Hahn, M.E., 2011. Role of DNA methylation of AHR1 and AHR2 promoters in differential sensitivity to PCBs in Atlantic Killifish; *Fundulus heteroclitus*. *Aquat. Toxicol.* 101 (1), 288-294.

Aniagu, S.O., Williams, T.D., Allen, Y., Katsiadaki, I., Chipman, J.K., 2008. Global genomic methylation levels in the liver and gonads of the three-spine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) after exposure to hexabromocyclododecane and 17- β oestradiol. *Environ. Int.* 34, 310-317.

APHA (American Public Health Association), AWWA (American Water Works Association), WEF (Water Environment Federation), 1995. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 18th ed. Washington, DC, 1995.

Avci, A., Kaçmaz, M., Durak, I., 2005. Peroxidation in muscle and liver tissues from fish in a contaminated river due to a petroleum refinery industry. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 60, 101-105.

Baccarelli, A., Bollati, V., 2009. Epigenetics and environmental chemicals. *Curr. Opin. Pediatr.* 21, 243–251.

Bacchetta, C., Cazenave, J., Parma, M. J., 2010. Responses of biochemical markers in the fish *Prochilodus lineatus* exposed to a commercial formulation of endosulfan. *Water, Air, Soil Pollut.* 216, 39-49.

Baderna, D., Maggioni, S., Boriani, E., Gemma, S., Molteni, M., Lombardo, A., Colombo, A., Bordonali, S., Rotella, G., Lodi, M., Benfenati, E., 2011. A combined approach to investigate the toxicity of an industrial landfill's leachate: Chemical analyses, risk assessment and *in vitro* assays. *Environ. Res.* 111, 603-613.

Bardakci, F., Skibinski, D.O.F., 1994. Application of the RAPD technique in tilapia fish: species and subspecies identification. *Heredity.* 73, 117-123.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

Çavas, T., Ergene-Gözükara, S., 2003. Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) as cytogenotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent. *Mutat. Res.* 538, 81-91.

Chandra, S., Chauhan, L. K. S., Murthy, R. C., Saxena, P. N., Pande, P. N., Gupta, S. K., 2005. Comparative biomonitoring of leachates from hazardous solid waste of two industries using *Allium* test. *Sci. Total Environ.* 347, 46-52.

Chen, C.-M., Yu, S.-C., Liu, M.-C., 2001. Use of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) and Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) in toxicity tests on different industrial effluents in Taiwan. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 40, 363-70.

Dunnett, C. W., 1955. A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. *J. Am. Stat. Assoc.* 50, 1096-1121.

Esteller, M., 2003. Relevance of DNA methylation in the management of cancer. *Lancet Oncol.* 4, 351-359.

FIESC (Federação das Indústrias do Estado de Santa Catarina), 2010. Santa Catarina em Dados / Unidade de Política Econômica e Industrial. Florianópolis, SC, Brasil. 136 p. Available from: http://www2.fiescnet.com.br/web/pt/site_topo/pei/info/santa-catarina-em-dados-2010 (accessed March 2011).

Franco, J. L., Trevisan, R., Posser, T., Trivella, D. B. B., Hoppe, R., Rosa, J. M., Dinslaken, D. F., Decker, H., Tasca, C.I., Leal, R.B., Marques, M.R.F.,

- Bainy, A.C., Dafre, A.L. 2010. Biochemical alterations in caged Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73(5), 864-72.
- Gabryelak, T., Akahori, A., Przybylska, M., Jo'zwiak, Z., Gerard, B., 2002. Carp erythrocyte lipids as a potential target for the toxic action of zinc ions. *Toxicol. Lett.* 132, 57-64.
- García-Medina, S., Razo-Estrada, A.C., Gómez-Oliva, L.M., Amaya-Chávez, A., Madrigal-Bujaidar, E., Galar-Martínez, M., 2010. Aluminum-induced oxidative stress in lymphocytes of common carp (*Cyprinus carpio*). *Fish Physiol. Biochem.* 36, 875-882.
- Girotti, A.W., 1998. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J. Lipid Res.* 39, 1529 -1542.
- Gopal, R., Narmada, S., Vijayakumar, R., Jaleel, C. A. 2009. Chelating efficacy of CaNa_2 EDTA on nickel-induced toxicity in *Cirrhinus mrigala* (Ham.) through its effects on glutathione peroxidase, reduced glutathione and lipid peroxidation. *C.R. Biologies.* 332, 685-696.
- Grisolia, C. K., Rivero, C.L.G., Starling, F.L.R.M., da Silva, I.C.R., Barbosa, A.C., Jose G. Dorea, J.G. 2009. Profile of micronucleus frequencies and DNA damage in different species of fish in a eutrophic tropical lake. *Genet. Mol. Biol.*, 32 (1), 138-143.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1989. *Free Radicals in Biology and Medicine*, second ed. Clarendon Press, Oxford.
- Hanson, N., Larsson, A., 2011. Biomarker analyses in caged and wild fish suggest exposure to pollutants in an urban area with a landfill. *Environ. Toxicol.* 26 (3), 315-324.
- Huang, D., Zhang, Y., Wang, Y., Xie, Z., Ji, W., 2007. Assessment of the genotoxicity in toad *Bufo raddei* exposed to petrochemical contaminants in Lanzhou Region, China. *Mutat. Res.* 629, 81-88.
- Jha, M. K., Kumar, V., Singh, R. J., 2001. Review of hydrometallurgical recovery of zinc from industrial wastes. *Resour., Conserv. Recycling.* 33, 1-22.
- Kostamo, A., Kukkonen, J. V. K., 2003. Removal of resin acids and sterols from pulp mill effluents by activated sludge treatment. *Water Res.* 37, 2813-2820.

Lewin, B., 2004. Controlling chromatin structure - DNA methylation is perpetuated by a maintenance methylase. In: Lewin, B. (Ed.), *Genes VIII*. Pearson Prentice Hall, pp. 680- 681.

Li, D., Lu, C. , Wang, L. , Hu, W., Cao, Z., Sun, D., Xia, H., Ma, X., 2009. Developmental mechanisms of arsenite toxicity in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Aquat. Toxicol.* 91, 229-237.

Lushchak, V. I., 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat. Toxicol.* 101 (1), 13-30.

Matias, W.G., Creppy, E.E, 1998a. Lipoperoxidação induzida pelo Ácido Ocadáico, uma toxina marinha. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento.* 4, 40-44.

Matias, W.G., Creppy, E.E., 1998b. 5-Methyldeoxycytosine as a biological marker of DNA damage induced by okadaic acid in Vero cells. *Environ. Toxic. Water.* 13, 83-88.

Minocha, A.K., Jain, N., Verma, C.L., 2003. Effect of organic materials on the solidification of heavy metal sludge. *Constr. Build. Mater.* 17, 77-81.

Mishra, A., Mohanty, B., 2008. Acute toxicity impacts of hexavalent chromium on behavior and histopathology of gill, kidney and liver of the freshwater fish, *Channa punctatus* (Bloch). *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 26(2), 136-141.

NIEHS (National Institute for Environmental Health Sciences), 2011. Report on Carcinogens. 12th ed. Washington, DC. Available from: <http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/roc/twelfth/roc12.pdf> (accessed May 2011).

Oakes, K.D., McMaster, M.E., Pryce, A.C., Munkittrick, K.R., Portt, C.B., Hewitt, L.M., MacLean, D.D., Van Der Kraak G.J., 2003. Oxidative stress and bioindicators of reproductive function in pulp and paper mill effluent exposed white sucker. *Toxicol. Sci.* 74, 51-65.

Oakes, K.D., Van der Kraak, G.J., 2003. Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. *Aquat. Toxicol.* 63, 447-463.

Osman, H. A. M., Ibrahim, T. B., Ali, A. T., Derwa, H. I. M., 2009. Field application of humic acid against the effect of cadmium pollution on cultured tilapia *Oreochromis niloticus*. *World Appl. Sci. J.* 6 (11), 1569-1575.

Pfohl-Leszkwicz, A., Fuchs R.P.P., Dirheimer G., 1984. In vitro enzymatic methylation of DNA substituted by N-2-aminofluorene. *FEBS Lett.* 178, 56-60.

- Picado, A., Mendonça, E., Silva, L., Paixão, S.M., Brito, F., Cunha, M.A., Leitão, S., Moura, I., Hernan, R., 2008. Ecotoxicological assessment of industrial wastewaters in Trancão River Basin (Portugal). *Environ.Toxicol.* 23 (4), 423-560.
- Pogribny, I., Beland, F.A., 2009. DNA hypomethylation in the origin and pathogenesis of human diseases. *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 2249-2261.
- Roberts, A.P., Oris, J.T., 2004. Multiple biomarker response in rainbow trout during exposure to hexavalent chromium. *Comp. Biochem. Phys. C.* 138, 221-228.
- Robertson, K.D., 2001. DNA methylation, methyltransferases, and cancer. *Oncogene.* 20, 3139-3155.
- Rosa, E.V.C., Giuradelli, T.M., Corrêa, A.X.R., Rörig, L.R., Schwingel, P.R., Resgalla, C., Radetski, C.M., 2007. Ecotoxicological evaluation of the short term effects of fresh and stabilized textile sludges before application in forest soil restoration. *Environ. Poll.* 146, 463-469.
- Sabo-Attwood, T., Ramos-Nino, M., Mossman, B.T., 2005. Environmental carcinogenesis. In: Chang, A., Ganz, P. (Eds.), *Oncology: an evidence-based approach.* Springer Verlag Publishers, pp. 233-243.
- Schwarzenbach, R.P., Escher, B.I., Fenner, K., Hofstetter, T.B., Johnson, C.A., Von Gunten, U., Wehrli, B., 2006. The challenge of micropollutants in aquatic systems. *Science*, 313, 1072-1077.
- Shugart, L.R., 1990. 5-Methyl deoxycytosine content of DNA from bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*) exposed to benzo[a]pyrene. *Environ. Toxicol. Chem.* 9 (2), 205-208.
- Shugart, L.R., 2000. DNA damage as a biomarker of exposure. *Ecotoxicology.* 9, 329- 340.
- Sisinno, C.L.S., 2003. Non-inert industrial solid waste disposal in landfill dumps: evaluation of toxicity and implications for the environment and human health. *Cad. Saúde Pública.* 19 (2), 369-374.
- Storey, K.B., 1996. Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 29, 1715-1733.
- Suji, G., Sivakami, S., 2008. Malondialdehyde, a lipid-derived aldehyde alters the reactivity of Cys34 and the esterase activity of serum albumin. *Toxicol. in Vitro.* 22, 618-624.

Traore, A., Ruiz, S., Baudrimont, I., Sanni, A., Dano, S. D., Guarigues, P. H., Narbonne, J.F., Creppy, E.E., 2000. Combined effects of okadaic acid and cadmium on lipid peroxidation and DNA bases modifications (m⁵dC and 8-(OH)-dG) in Caco-2 cells. *Mol. Toxicol.* 74, 79-84.

Traverso, T., Menini, S., Maineri, E.P., Patriarca, S., Odetti, P., Cottalasso, D., Marinari, U.M., Pronzato, M.A., 2004. Malondialdehyde, a lipoperoxidation-derived aldehyde, can bring about secondary oxidative damage to proteins. *J. Gerontol. A- Bio.* 59 (9), 890-895.

Üner, N., Oruç, E.Ö., Sevgiler, Y., Şahin, N., Durmaz, H., Usta, D., 2006. Effects of diazinon on acetylcholinesterase activity and lipid peroxidation in the brain of *Oreochromis niloticus*. *Environ. Toxicol. Phar.* 21, 241-245.

U.S.EPA (Environmental Protection Agency), 1999. Dunnett Program Version 1.5 Users' Manual. Environmental Monitoring Systems Laboratory, Ecological Monitoring Research Division, Cincinnati, OH. Available from www.epa.gov/nerleerd/stat2.htm (accessed July 2011).

Uz-Zaman, M., Sarker, S.R., Hossain, S., 2008. The effects of industrial effluent discharge on lipid peroxide levels of punti fish (*puntius sophore*) tissue in comparison with those of freshwater fish. *J. Food Lipids.* 15, 198-208.

Vandegheuchte, M.B., Lemièrre, F., Janssen, C.R., 2009. Quantitative DNA-methylation in *Daphnia magna* and effects of multigeneration Zn exposure. *Comp. Biochem. Phys. C.* 150, 343-348.

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

Waalkes, M.P., 2003. Cadmium carcinogenesis. *Mutat. Res.* 533, 107-120.

Wahbi, O.M., Shalaby, S.M., El-Dakar, A. Y. (2004). Effects of pulp and paper industrial effluent on some blood parameters, gonads and flesh proteins in experimentally exposed striped seabream *Lithognathus mormyrus*. *Egypt. J. Aquat. Res.* 30(A), 25-42.

Wang, Y., Wang, C., Jiliang Zhang, J., Yixin Chen, Y., Zhenghong Zuo, Z., 2009. DNA hypomethylation induced by tributyltin, triphenyltin, and a mixture of these in *Sebastiscus marmoratus* liver. *Aquat. Toxicol.* 95, 93-98.

Wilson, A.S., Power, B.E., Molloy, P.L., 2007. DNA hypomethylation and human diseases. *Biochim. Biophys. Acta.* 1775 (1), 138-162.

Zhang, J., Fu, Y., Li, J., Wang, J., He, B., Xu, S., 2009. Effects of subchronic cadmium poisoning on DNA methylation in hens. *Environ.Toxicol. Phar.* 27(3), 345-349.

Figure 1. (A) Percentage of DNA methylation ($m^5dC/(m^5dC + dC)*100$) related to erythrocytes of *O. niloticus* exposed to soluble fractions of textile industrial waste, negative and positive control with potassium dichromate (2.5 mg/L). (B) Percentage of DNA methylation ($m^5dC/(m^5dC + dC)*100$) related to erythrocytes of *O. niloticus* exposed to the soluble fraction of metal-mechanic industrial waste, negative control and positive control with potassium dichromate (2.5 mg/L). (C) Percentage of DNA methylation ($m^5dC/(m^5dC + dC)*100$) related to erythrocytes of *O. niloticus* exposed to the soluble fraction of pulp and paper industrial waste, negative control and positive control with potassium dichromate (2.5mg/L). The values represent the average of each replicate \pm standard deviation (n = 2). (*) at $p < 0.05$

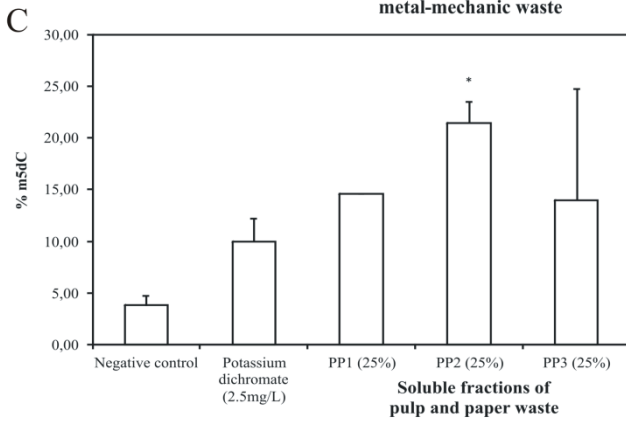
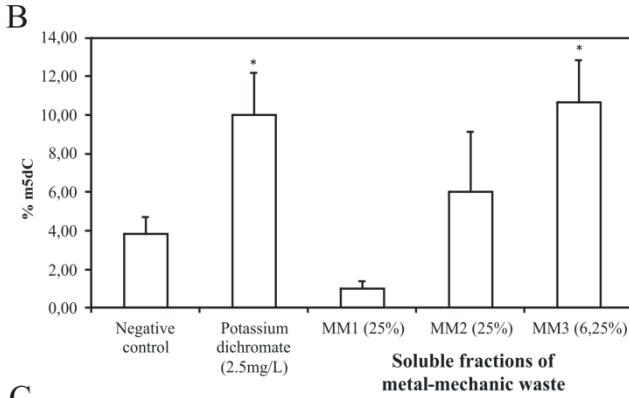
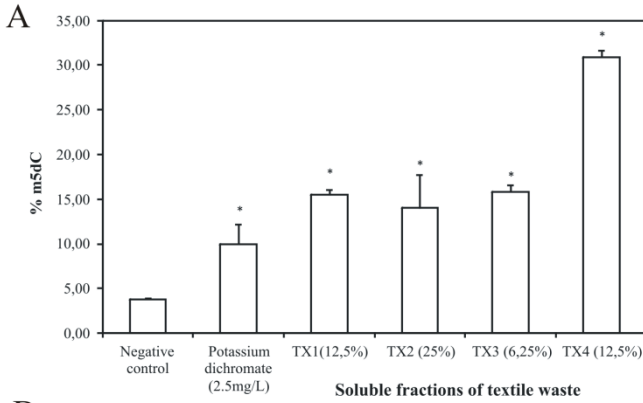


Table 1: Characteristics and general composition of industrial waste samples collected in the Industrial and Sanitary Landfill of Blumenau, as classified by NBR 10004 (ABNT, 2004c).

Sample n ^o	Industrial waste ^a	Composition
TX1, TX2, TX3 and TX4	Sludge from textile treatment plant	Iron, aluminum, phenol, zinc, chromium, lead, manganese, nickel and copper. (Rosa et al., 2007)
MM1 and MM2	Sludge from metal-mechanic treatment plant	Chromium, iron, nickel, zinc, copper, manganese, lead and cadmium. (Chandra et al., 2005; Jha et al., 2001)
MM3	Sludge from electroplating treatment plant	
PP1, PP2 and PP3	Sludge from the pulp and paper treatment plant	Chlorophenol compounds, resin acids, dioxins, sterols, zinc, copper and iron (Chen et al., 2001; Kostamo and Kukkonen, 2003)

^a Description according to the Classification Report presented to the Industrial and Sanitary Landfill of Blumenau by companies responsible for these industrial waste.

Table 2: Concentrations of exposure to the soluble fractions of industrial waste according to its reference.

Industry type	Sample n ^o	Concentration	Reference
	TX3	6.25%	
Textile	TX1 and TX4	12.5%	adapted from Çavas and Ergene-Gözücara (2003)
	TX2	25.0%	
Metal-mechanic	MM3	6.25%	adapted from Chen et al. (2001)
	MM1 and MM2	25.0%	adapted from Mishra and Mohanty (2008)
Pulp and paper	PP1, PP2 and PP3	25.0%	adapted from Wahbi et al. (2004)

Table 3: pH and dissolved oxygen values observed in the raw samples of soluble fractions of industrial waste

Industry Type	Sample	pH	DO (mg/L)
	TX1	6.83	2.9
	TX2	7.75	5.8
Textile	TX3	7.71	4.0
	TX4	6.90	3.2
	MM1	8.89	4.3
Metal-mechanic	MM2	9.47	4.7
	MM3	6.90	5.8
	PP1	6.72	4.1
Pulp and paper	PP2	8.17	5.6
	PP3	6.30	3.4

Table 4: MDA rates in erythrocytes of *Oreochromis niloticus* exposed to different concentrations of soluble fractions of industrial solid waste, measured by HPLC. The results are expressed as means \pm SD in nM MDA/mg protein.

Industry Type	Sample	Concentration	MDA rate (nM MDA/mg of protein)
Negative control	-	-	27.05 \pm 8.32
Textile	TX1	12.50%	132.360 \pm 27.55*
	TX2	25%	140.28 \pm 11.4 *
	TX3	6.25%	48.01 \pm 0.52
	TX4	12.50%	40.17 \pm 2.06
Metal-mechanic	MM1	25%	133.5 \pm 19.5 *
	MM2	25%	190.02 \pm 12.62 *
	MM3	6.25%	125.34 \pm 3.04 *
Pulp and paper	PP1	25%	55.77 \pm 6.25
	PP2	25%	44.93 \pm 4.5
	PP3	25%	28.56 \pm 1.97
Positive control	K ₂ Cr ₂ O ₇	2.5 mg/L	168.09 \pm 58.15 *

(*) p < 0.05