

ALESSANDRA CUNHA LOPES

**CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE EFLUENTE DE
POLPA KRAFT BRANQUEADA DE EUCALIPTO ANTES E APÓS
TRATAMENTO POR LODOS ATIVADOS E OZÔNIO**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2010**

ALESSANDRA CUNHA LOPES

**CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE EFLUENTE DE
POLPA KRAFT BRANQUEADA DE EUCALIPTO ANTES E APÓS
TRATAMENTO POR LODOS ATIVADOS E OZÔNIO**

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

APROVADA: 23 de abril de 2010.

Prof. Jorge Luiz Colodette
(Co-orientador)

Prof. Cláudio Mudado Silva
(Co-orientador)

Prof^a. Ana Augusta Passos Rezende

Prof. José Lívio Gomide

Prof^a. Ann Honor Mounteer
(Orientadora)

"A cada dia que vivo mais me convenço de que o desperdício da vida está no amor que não damos, nas forças que não usamos, na prudência egoísta que nada arrisca e que, esquivando-nos do sofrimento, perdemos também a felicidade".

Carlos Drummond de Andrade

Ao meu avô Odilon
dedico esta dissertação.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar meu caminho, permitindo-me vencer diante cada obstáculo.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Engenharia Civil pela excelente formação e oportunidades concedidas.

À professora Ann Honor Mounteer pela oportunidade, confiança, orientação e amizade durante todos esses anos.

Aos professores Cláudio Mudado, Jorge Luiz Colodette e Rafael Bastos, pelas sugestões, conselhos e colaboração na realização desse trabalho.

Aos professores Ana Augusta, Cláudio Mudado e Jorge Colodette pela participação na banca de defesa.

À Teynha e David pela fundamental colaboração na realização das análises laboratoriais.

Ao professor Sumpter por permitir a utilização da levedura, essencial para realização da pesquisa.

Ao laboratório de Controle de Qualidade da Água, da Divisão de Água e Esgotos/UFV e ao Laboratório de Celulose e Papel/UFV pela estrutura e equipamentos cedidos para viabilizar a realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Controle da Poluição das Águas da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) pelo treinamento concedido, em especial à Amanda e Bruna por todos os ensinamentos, paciência e ajuda constante.

À indústria de polpa Kraft branqueada, pela concessão dos efluentes.

À CAPES, pela bolsa de mestrado concedida.

A minha família maravilhosa, em especial aos meus pais, Cida e José, e a minha avó Altina pelo amor incondicional e pelo grande exemplo de vida.

Ao Fabrício pelo amor, companhia, paciência e por tornar meus dias mais felizes e agradáveis.

Às amigas de república Juliana, Viviane, Virgínia, Amanda e Fran por estarem sempre presentes e ajudarem em todos os momentos.

Aos irmãos científicos Demétrius, Mauro, Henrique, Flávio, Cleuber, Rosane, Endrik, Renata e Anderson por toda amizade e ajuda nas pesquisas.

Aos amigos da Engenharia Ambiental, sempre presentes em todos os momentos.

A todos os estagiários e funcionários da ETA, pelo grande apoio e convivência diária.

A todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

ALESSANDRA CUNHA LOPES, filha de José Geraldo Cal Lopes e Maria Aparecida Cunha Lopes, nasceu no município de Ervália, Minas Gerais, no dia 25 de novembro de 1984.

Cursou o ensino fundamental na Escola Estadual Professor David Procópio em Ervália (MG) e o ensino médio no Colégio Equipe em Viçosa (MG), onde concluiu em 2002.

Em março de 2003 ingressou no curso de graduação em Engenharia Ambiental na Universidade Federal de Viçosa (MG), concluindo o curso em janeiro de 2008. Em março de 2008 ingressou no curso de Pós-Graduação em Engenharia Civil, área de concentração Saneamento Ambiental, da Universidade Federal de Viçosa (MG), concluindo os requisitos necessários à obtenção do título de “Magister Scientiae” em abril de 2010.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	viii
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xi
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xvi
1 – INTRODUÇÃO	1
2 – OBJETIVOS.....	2
3 - REVISÃO DE LITERATURA	3
3.1 - A Indústria de Polpa Kraft Branqueada de Eucalipto Brasileira.....	3
3.2 - Os Efluentes da Indústria de Polpa Kraft Branqueada.....	5
3.2.1 – Atividade Biológica de Efluentes de Celulose Kraft Branqueada	6
3.2.2 – Compostos de Alta e Baixa Massa Molar	10
3.3 – Ensaio Ecotoxicológicos.....	11
3.3.1 – Organismos Teste.....	13
3.3.2 – Apresentação dos Resultados.....	15
3.4 – Atividade Estrogênica.....	15
3.5 – Ozonização.....	19
3.5.1 – Ozônio	19
3.5.2 – Uso da Ozonização no Tratamento de Efluentes de Celulose...	20
4 - MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1 – Efluentes.....	22
4.2 – Plano Experimental.....	22
4.3 – Fracionamento dos Efluentes em AMM e BMM.....	23
4.4 - Caracterização Físico-Química dos Efluentes	23
4.5 – Ensaio Ecotoxicológicos.....	25
4.5.1 – Toxicidade Aguda	25
4.5.2 – Toxicidade Crônica	25
4.5.3 – Avaliação da Toxicidade do Efluente no Corpo Receptor.....	27
4.6 – Ensaio Yes.....	28

4.6.1 – Procedimento de Análise	28
4.6.2 – Curva Padrão	30
4.7 – Estudo da Identificação da Toxicidade.....	31
4.7.1. Ajuste de pH.....	31
4.7.2. Filtração	32
4.7.3. Aeração	32
4.7.4. Extração em Fase Sólida.....	32
4.7.5. Quelação com EDTA	33
4.8. Ozonização.....	33
5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
5.1. Caracterização Físico-Química.....	35
5.2. Ensaio De Toxicidade.....	37
5.3.1. Toxicidade Aguda	37
5.3.2. Toxicidade Crônica	37
5.3.3. Estudo De Identificação Da Toxicidade	41
5.3.3.1. Ensaio com a alga <i>Pseudokirchneriella Subcapitata</i>	41
5.3.3.2. Ensaio com o Microcrustáceo <i>Ceriodaphnia Dúbia</i>	44
5.4. Ensaio Yes.....	45
5.5. Tratamento com Ozônio.....	48
6 - CONCLUSÕES	50
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
ANEXOS	60
DADOS EXPERIMENTAIS E RESULTADOS PRELIMINARES	60
ANEXO A – ENSAIO YES: CULTIVO DA LEVEDURA E PREPARO DE SOLUÇÕES.....	61
ANEXO B – DADOS EXPERIMENTAIS DOS ENSAIOS DE TOXICIDADE AGUDA E CRÔNICA.....	63
ANEXO C – DADOS EXPERIMENTAIS DOS TRATAMENTOS COM OZÔNIO.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas
AFNOR - *Association Française de Normalisation*
AMM - Alta Massa Molar
AOX - Halógenos Orgânicos Adsorvíveis em Carvão Ativado
APHA - *American Public Health Association*
ASTM - *American Society for Testing and Materials*
BMM - Baixa Massa Molar
BRACELPA – Associação Brasileira de Celulose e Papel
CE₅₀ - Concentração Efetiva
CENO – Maior Concentração de Efeito não Observado
CEO - Menor Concentração de Efeito Observado
CI₂₅ – Concentração de Inibição
CL₅₀ - Concentração Letal Mediana
CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo
CONAMA – Conselho Nacional de Meio Ambiente
COT - Carbono orgânico total
CPRG - Clorofenol Vermelho-β-d-Galactopiranosida
DBO - Demanda Bioquímica de Oxigênio
DQO - Demanda Química de Oxigênio
ECF – *Elemental Chlorine Free*
EPA - *Environmental Protection Agency*
EQ – E2 – Equivalentes de Estradiol
ERE – Elementos de Resposta Estrogênica
OD - Oxigênio Dissolvido
pH – Potencial Hidrogeniônico
POAs - Processos Oxidativos Avançados
REh – Receptor de Estrogênio Humano
TCF – *Totally Chlorine Free*
TIE – *Toxicity Identification Evaluation*

UV – Ultra Violeta

VC – Valor Crônico

VT - Vitelogenina

YES – *Yeast Estrogen Screen*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura do 17β -estradiol (1) um hormônio natural e do β -sitosterol (2) um extrativo lipofílico da madeira, que apresenta atividade estrogênica	8
Figura 2 - Esquema do sistema de expressão do estrogênio induzível na levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	18
Figura 3 - Resumo do plano experimental	23
Figura 4 - Esquema do procedimento de análise do ensaio YES.....	29
Figura 5 - Representação dos 4 parâmetros da equação 3.4 (A_1 , A_2 , X_0 , p) que descrevem a curva sigmoideal	31
Figura 6 - Visualização dos efluentes após o processo de separação baseada em baixa (1) e alta massa molar (2)	36
Figura 7 - Toxicidade crônica do efluente secundário ao microcrustáceo <i>P. subcapitata</i> , após diferentes manipulações físico-química.....	43
Figura 8 - Toxicidade crônica do efluente secundário ao microcrustáceo <i>C. dubia</i> , após diferentes manipulações físico-química.....	45
Figura 9 - Curva dose-resposta de 17β -estradiol no ensaio YES.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Caracterização físico-química dos efluentes primário e secundário (valores médios \pm desvios padrão, n=5).....	35
Tabela 2 - Caracterização físico-química das frações de alta (AMM) e baixa (BMM) massa molar dos efluentes primário e secundário (valores médios \pm desvios padrão, n=5)	36
Tabela 3 - Efeito crônico dos efluentes primário e secundário obtido através de ensaios com a alga verde <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	38
Tabela 4 - Efeito crônico dos efluentes primário e secundário obtidos através de ensaios com o microcrustáceo <i>Ceriodaphnia dubia</i>	39
Tabela 5 - Efeito crônico das frações de AMM e BMM expresso como IC ₂₅ obtidos através de ensaios com a alga verde <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	40
Tabela 6 - Efeito crônico do efluente secundário, expresso como CI ₂₅ , obtido através de ensaios com a alga verde <i>P. subcapitata</i> após manipulações para identificação da toxicidade.....	43
Tabela 7 - Efeito crônico do efluente secundário, expresso como CI ₂₅ , obtido através de ensaios com a alga verde <i>C. dubia</i> após manipulações para identificação da toxicidade.....	44
Tabela 8 - Resultado do ensaio YES expresso como EQ-E2 para os efluentes primário e secundário (valor médio \pm desvio padrão, n = 4)	46
Tabela 9 - Resultado do ensaio YES expresso como EQ-E2 para o efluente secundário após manipulações.....	47
Tabela 10 – Efeito da ozonização (50 mgO ₃ L ⁻¹) sobre as características físico-químicas do efluente secundário (valor médio \pm desvio padrão, n = 5).....	48
Tabela B.1 - Resultados experimentais do teste de toxicidade aguda para os Efluentes Primário e Secundário.....	63
Tabela B.2 - Resultados experimentais do teste de toxicidade crônica com a alga verde <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> para o Efluente Primário	64

Tabela B.3 - Resultados experimentais do teste de toxicidade crônica com a alga verde <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> para o Efluente Secundário	65
Tabela B.4 - Resultados experimentais do teste de toxicidade crônica com a alga verde <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> para o Efluente Secundário após ajuste de pH.....	66
Tabela B.5 - Resultados experimentais do teste de toxicidade crônica com a alga verde <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> para o Efluente Secundário após filtração em membrana de fibra de vidro	67
Tabela B.6 - Resultados experimentais do teste de toxicidade crônica com a alga verde <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> para o Efluente Secundário após aeração.....	67
Tabela B.7 - Resultados experimentais do teste de toxicidade crônica com a alga verde <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> para o Efluente Secundário após extração em fase sólida.....	68
Tabela B.8 - Resultados experimentais do teste de toxicidade crônica com a alga verde <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> para o Efluente Secundário após extração em fase sólida (analito).....	68
Tabela B.9 - Resultados experimentais do teste de toxicidade crônica com a alga verde <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> para o Efluente Secundário após quelação com EDTA.....	69
Tabela B.10 - Resultados experimentais do teste de toxicidade crônica com a alga verde <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> para o Efluente Secundário após ozonização.....	69
Tabela B.11 - Resultados experimentais do teste de toxicidade crônica com <i>Ceriodaphnia dubia</i> para o Efluente Primário e Secundário	70
Tabela B.12 - Resultados experimentais do teste de toxicidade crônica com <i>Ceriodaphnia dubia</i> para o Efluente Secundário após ajuste do pH	71
Tabela B.13 - Resultados experimentais do teste de toxicidade crônica com <i>Ceriodaphnia dubia</i> para o Efluente Secundário após aeração	72
Tabela B.14 - Resultados experimentais do teste de toxicidade crônica com <i>Ceriodaphnia dubia</i> para o Efluente Secundário após filtração em membrana de fibra de vidro.....	72

Tabela B.15 - Resultados experimentais do teste de toxicidade crônica com <i>Ceriodaphnia dubia</i> para o Efluente Secundário após extração em fase sólida.....	73
Tabela B.16 - Resultados experimentais do teste de toxicidade crônica com <i>Ceriodaphnia dubia</i> para o Efluente Secundário após extração em fase sólida (analito).....	73
Tabela B.17 - Resultados experimentais do teste de toxicidade crônica com <i>Ceriodaphnia dubia</i> para o Efluente Secundário após quelação com EDTA.....	74
Tabela B.18 - Resultados experimentais do teste de toxicidade crônica com <i>Ceriodaphnia dubia</i> para o Efluente Secundário após ozonização	74
Tabela C.1 - Resultados experimentais do teste de toxicidade crônica com a alga verde <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> para o Efluente Primário	75

RESUMO

LOPES, Alessandra Cunha, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Abril de 2010. **Caracterização da atividade biológica de efluente de polpa kraft branqueada de eucalipto antes e após tratamento por lodos ativados e ozônio.** Orientadora: Ann Honor Mounteer. Co-orientadores: Jorge Luiz Colodette e Cláudio Mudado Silva.

A indústria de polpa kraft branqueada de eucalipto representa um dos setores mais importantes para a economia nacional, porém é responsável pela geração de grandes volumes de efluentes caracterizados pela presença significativa de matéria orgânica, parte dela recalcitrante. Estudos com ecossistemas modelos indicam uma correlação direta entre a matéria orgânica remanescente após o tratamento biológico e a atividade biológica dos efluentes no ambiente aquático, sendo a toxicidade e a atividade endócrina as principais expressões dessa atividade biológica em organismos aquáticos do corpo receptor. O presente estudo teve como objetivo quantificar a atividade biológica em um efluente de uma fábrica de celulose kraft branqueada através de ensaios de toxicidade aguda e crônica e do ensaio YES e, avaliar o efeito da ozonização na remoção da atividade biológica. Para a pesquisa foram coletados efluentes primários e secundários de uma fábrica brasileira de celulose kraft branqueada. O efluente secundário passou por um estudo de identificação da toxicidade e foi tratado com ozônio na dose de $50 \text{ mgO}_3 \text{ L}^{-1}$. O efluente estudado não apresentou efeito tóxico agudo mediante ensaios realizados com o microcrustáceo *Daphnia similis*, mas apresentou efeito tóxico crônico através dos ensaios realizados com a alga verde *Pseudokirchneriella subcapitata* e com o microcrustáceo *Ceriodaphnia dubia*. Em geral, os resultados apontam para uma remoção da toxicidade crônica após o tratamento biológico realizado na indústria, porém apesar do tratamento reduzir a toxicidade, o efluente secundário ainda apresentou efeito crônico. A toxicidade foi mais elevada para as frações de alta massa molar (AMM), nas quais se concentra a fração recalcitrante do efluente. Em alguns dias de coleta, a diluição do efluente que seria necessária para eliminar o efeito tóxico crônico era

maior do que a diluição do efluente no corpo receptor. O efluente também apresentou atividade estrogênica, quantificada pelo ensaio YES. Por meio do estudo de identificação da toxicidade, foi identificada que a fração recalcitrante do efluente, que inclui lignina residual, extrativos e seus subprodutos, é responsável pela toxicidade e atividade estrogênica. A ozonização foi eficiente na remoção da atividade biológica, pois após o tratamento houve uma redução da toxicidade e da atividade estrogênica do efluente secundário.

ABSTRACT

LOPES, Alessandra Cunha, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, April, 2010.

Biological activity of bleached kraft pulp mill effluents before and after activated sludge and ozone treatments. Adviser: Ann Honor Mounteer. Co-advisers: Jorge Luiz Colodette and Cláudio Mudado Silva.

The bleached eucalyptus kraft pulp industry, one of the most important sectors of the Brazilian economy, is responsible for generating large volumes of effluent that contains high organic loads, part of which is recalcitrant to conventional (biological) treatment. Studies with model ecosystems have indicated a direct correlation between organic matter remaining after biological treatment and biological activity of effluents in the aquatic environment, with toxicity and endocrine disruption being the main expressions of this biological activity in aquatic organisms present in receiving waters. The objective of the present study was to quantify the biological activity in bleached kraft pulp mill effluent using acute and chronic toxicity and endocrine disruption assays and to evaluate the effect of ozonation on removal of the biological activity. To this end, primary and secondary effluents were collected at a Brazilian bleached kraft pulp mill. The secondary effluent underwent a toxicity identification evaluation and was treated with $50 \text{ mgO}_3 \text{ L}^{-1}$. The primary and secondary effluents presented no acute toxicity to the microcrustacean *Daphnia similis*, but presented chronic toxicity towards the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata* and the microcrustacean *Ceriodaphnia dubia*. In general, chronic toxicity was reduced during biological treatment in the mill's activated sludge effluent treatment plant, although the secondary effluent still presented chronic toxicity. Toxicity was higher in the high molar mass effluent fractions that contain the recalcitrant organic matter. On some collection dates, the effluent dilution necessary to eliminate the chronic toxicity effect was higher than the dilution occurring through effluent discharge to the receiving waters. The primary and secondary effluents also presented estrogenic activity, as quantified in the YES assay.

Through the toxicity identification evaluation study, it was found that the recalcitrant organic matter, that includes residual lignin, extractives and their byproducts, is responsible for the estrogenic activity. Ozone treatment of the secondary effluent reduced its toxicity and estrogenic activity.

1 – INTRODUÇÃO

A indústria de polpa kraft branqueada de eucalipto representa um dos setores mais importantes para a economia nacional. Segundo a Associação Brasileira de Celulose e Papel (BRACELPA), a indústria de celulose cresceu 6,0 % em 2009, totalizando 13,4 toneladas. Porém, as fábricas de polpa kraft branqueada são enquadradas como unidades potencialmente poluidoras dos corpos d'água, pois além de volumes elevados, os efluentes possuem uma quantidade significativa de matéria orgânica, parte dela recalcitrante ao tratamento biológico.

As substâncias recalcitrantes e biologicamente ativas nos efluentes de polpa kraft branqueada originam da madeira e são derivadas da lignina e, ou extrativos lipofílicos. Estudos com ecossistemas modelos indicam uma correlação direta entre a matéria orgânica remanescente após o tratamento biológico e a atividade biológica dos efluentes no ambiente aquático, sendo a toxicidade e a atividade endócrina as principais expressões dessa atividade biológica em organismos aquáticos do corpo receptor.

Considerando que efluentes de polpa kraft branqueada ainda podem conter substâncias nocivas à vida aquática nos corpos receptores, mesmo após o tratamento biológico, torna-se necessário avaliar a atividade biológica dos efluentes, identificar as substâncias responsáveis pela mesma e desenvolver técnicas alternativas para eliminá-la.

Entre essas tecnologias destacam-se os processos oxidativos que são processos químicos de tratamento que se baseiam na formação de espécies químicas altamente reativas, capazes de oxidar moléculas orgânicas complexas. A ozonização é um dos processos de tratamento oxidativos que vem sendo aplicado visando melhorar a qualidade final dos efluentes da indústria de polpa kraft branqueada antes de seu lançamento nos corpos aquáticos.

2 – OBJETIVOS

O objetivo principal desta pesquisa foi quantificar a atividade biológica no efluente de uma fábrica brasileira de polpa kraft branqueada, determinar a natureza das substâncias responsáveis pela mesma e avaliar uma alternativa de tratamento avançado com ozônio para eliminar essa atividade. Os objetivos específicos do projeto foram:

- Quantificar a toxicidade aguda e crônica do efluente, utilizando ensaios ecotoxicológicos padronizados;
- Quantificar a atividade estrogênica, através do ensaio YES (*yeast estrogen screen*) no efluente industrial;
- Quantificar a remoção da matéria orgânica de alta e baixa massa molar e da atividade biológica em sistema industrial de tratamento por lodos ativados;
- Avaliar a natureza dos compostos responsáveis pela atividade biológica nos efluentes, e;
- Aplicar o pós-tratamento com ozônio como forma de eliminar a atividade biológica e a matéria orgânica recalcitrante.

3 - REVISÃO DE LITERATURA

3.1 - A INDÚSTRIA DE POLPA KRAFT BRANQUEADA DE EUCALIPTO BRASILEIRA

A indústria de polpa kraft branqueada de eucalipto é um dos setores industriais mais importantes do mundo. Esta indústria é particularmente importante para a economia brasileira devido à abundância de recursos florestais. Segundo dados da BRACELPA (2010), em 2008 o Brasil foi o quarto maior produtor de celulose no mundo, com produção anual de quase 12 toneladas, das quais a maior parte (aproximadamente 9,5 toneladas) é de pasta celulósica de fibra curta branqueada. Em 2009, houve um crescimento de 6,0% na produção de celulose, totalizando 13,4 toneladas. Atualmente existem mais de 400 fábricas (de celulose, pastas de alto rendimento e papel) distribuídas por todo território nacional, sendo a maioria encontrada nos estados de São Paulo, Minas Gerais e Paraná.

No Brasil, usa-se preferencialmente madeira de *Eucalyptus grandis*, e o principal processo empregado na maioria das fábricas de celulose e papel é o processo kraft, que tem como principal objetivo a remoção da lignina e dos extrativos da madeira e a produção da celulose branqueada, a qual será posteriormente utilizada na fabricação de papel (NAVARRO, 2004).

No processo químico kraft, a madeira sob forma de cavacos, é tratada em vasos de pressão, denominados digestores, com soda cáustica e sulfeto de sódio (processo de polpação ou cozimento). Este processo químico visa dissolver a lignina, preservando a resistência das fibras, obtendo-se dessa maneira uma pasta forte (*kraft* significa forte em alemão), com rendimento entre 50 a 60% (SOUZA, 2001). A coloração marrom da celulose, mesmo após esta etapa, é devido à presença, ainda que reduzida, da lignina. Em seguida, tem-se a etapa de branqueamento, onde são adicionadas substâncias oxidantes com a finalidade de retirar o restante da lignina e branquear a celulose gerada no processo de polpação. Depois de branqueada a celulose é seca nas máquinas de secagem e, posteriormente, embalada ou enviada para as máquinas de papel, quando é o caso

de fábricas integradas. A celulose branqueada pode ser usada para diversos fins, inclusive na produção de papéis para imprimir e escrever, papéis especiais e papéis sanitários.

A utilização do cloro elementar foi uma técnica utilizada por muito tempo. Esse procedimento consiste na utilização do cloro gasoso ou água de cloro para o branqueamento da polpa. Em 1986, esse processo foi identificado como contribuidor na formação de dioxinas poli-cloradas e dibenzo-furanos, ambos compostos reconhecidos como altamente tóxicos e cancerígenos (SOUZA, 2001). Devido a este fato, atualmente existe uma forte tendência pela utilização de processos de branqueamento isentos do cloro elementar (processos ECF, *Elemental Chlorine Free*) e inclusive, isentos de qualquer insumo clorado (processos TCF, *Totally Chlorine Free*). Estes novos procedimentos permitiram a redução e, ou eliminação de compostos organoclorados no efluente. As seqüências de branqueamento podem apresentar variações, mas rotineiramente se alternam estágios ácidos, nos quais se utiliza principalmente dióxido de cloro, e estágios alcalinos, nos quais se utiliza hidróxido de sódio combinado ou não com oxigênio e, ou peróxido de hidrogênio. Entre um estágio ácido e um alcalino a celulose passa por um processo de lavagem para remoção dos resíduos químicos e dos materiais orgânicos fragmentados pelos agentes de branqueamento.

Na etapa de branqueamento é gerado o maior volume de efluentes líquidos em uma indústria de polpa kraft branqueada, sendo estes caracterizados por uma alta carga de matéria orgânica oriundo da própria matéria prima, a madeira. O efluente também é caracterizado pela presença de lignina e carboidratos e uma variedade de outros compostos orgânicos, gerados nos estágios de branqueamento, extraídos através da operação de lavagem.

Os efluentes do branqueamento reunidos com os demais efluentes líquidos da indústria dão origem ao efluente geral, ou final, que é destinado à estação de tratamento de efluentes (ETE), onde deverá receber o tratamento necessário, para posterior lançamento aos corpos receptores.

3.2 - OS EFLUENTES DA INDÚSTRIA DE POLPA KRAFT BRANQUEADA

Os efluentes da indústria de polpa kraft branqueada são misturas complexas, constituídas de vários compostos químicos derivados de materiais extraídos da madeira utilizada durante a produção da celulose. Normalmente os efluentes irão conter lignina, carboidratos e extrativos derivados da madeira. Portanto, tornam-se uma fonte importante de poluição hídrica, uma vez que contêm uma significativa carga de matéria orgânica, parte dela recalcitrante ao tratamento biológico (POKHREL e VIRARAGHAVAN, 2004).

A quantidade e qualidade dos efluentes gerados nas fábricas de polpa kraft branqueada dependem da natureza da matéria-prima, do produto final, da capacidade de tratamento dos efluentes e do reúso da água dentro da fábrica (ALI e SREEKRISHNAN, 2001). Nas últimas décadas, esta indústria tem sido obrigada a modificar e adaptar seus processos de produção com o principal objetivo de melhorar seu desempenho ambiental e cumprir as exigências ambientais legais cada vez mais restritivas. O consumo médio de água na indústria brasileira na década de 1970 era de aproximadamente 110 m^3 por tonelada de celulose seca ao ar ($110 \text{ m}^3 \text{ tsa}^{-1}$). Atualmente o consumo de água varia de $30 \text{ m}^3 \text{ tsa}^{-1}$ a $60 \text{ m}^3 \text{ tsa}^{-1}$, o que, apesar da grande redução, ainda resulta em grandes volumes de efluentes a serem tratados antes do lançamento nos corpos receptores (XAVIER et. al., 2006).

A caracterização dos efluentes, no que diz respeito à matéria orgânica, se dá pelos parâmetros de demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e demanda química de oxigênio (DQO). Outro parâmetro importante é o AOX, que mede a quantidade de compostos organoclorados, os quais estão presentes em efluentes devido ao processo de branqueamento da polpa com dióxido de cloro. Efluentes de polpa kraft branqueada contêm de 500 a 1500 mg L^{-1} de DQO, 200 a 800 mg L^{-1} de DBO_5 e 5 a 20 mg L^{-1} de AOX, além de apresentarem elevada cor (MOUNTEER et al., 2007). A biodegradabilidade dos efluentes, medida pela razão DBO_5/DQO , geralmente se encontra na faixa de 0,3 a 0,5 (POKHREL e VIRARAGHAVAN, 2004), indicando a presença de matéria orgânica não-biodegradável, ou recalcitrante ao tratamento biológico.

O tratamento de efluentes nas fábricas brasileiras tem sido realizado quase que exclusivamente por processos biológicos aeróbios, como o sistema de lodos ativados e lagoas aeradas. Os compostos recalcitrantes ou refratários não são degradados pelos microrganismos normalmente presentes em sistemas biológicos de tratamento, nos tempos usuais de detenção hidráulica aplicados, sendo lançados nos corpos receptores. Dessa forma, após o tratamento biológico, os efluentes ainda podem conter substâncias nocivas à vida aquática.

As substâncias recalcitrantes e biologicamente ativas nos efluentes de fábricas de polpa kraft branqueada originam da madeira e são derivadas da lignina e, ou extrativos lipofílicos, sendo que algumas dessas são conhecidas como estrogênios ambientais e pertencem ao grupo dos compostos perturbadores endócrinos (MOUNTEER *et al.*, 2007). Desta forma, torna-se necessário avaliar a atividade biológica dos efluentes de fábricas brasileiras.

3.2.1 – ATIVIDADE BIOLÓGICA DE EFLUENTES DE CELULOSE KRAFT BRANQUEADA

Efluentes de fábricas de polpa kraft branqueada de eucalipto contêm compostos recalcitrantes que incluem lignina residual, extrativos e seus subprodutos clorados, resultantes da reação desses componentes da madeira com os reagentes de branqueamento (HEWITT *et al.*, 2006). Estudos com ecossistemas modelos indicam uma correlação direta entre a matéria orgânica remanescente após o tratamento biológico e a atividade biológica dos efluentes no ambiente aquático (KONDURU *et al.*, 2001), sendo a toxicidade e a atividade endócrina entre as principais expressões dessa atividade biológica em organismos aquáticos do corpo receptor (HEWITT *et al.*, 2006).

Apesar dos tratamentos secundários reduzirem a toxicidade, efluentes de polpa kraft branqueada ainda apresentam efeitos crônicos em organismos aquáticos. Pesquisas realizadas por Furley *et al.* (2009) avaliaram a toxicidade de efluentes de quatro fábricas de celulose e papel na América Latina. Os efluentes foram avaliados usando a técnica do TIE (*Toxicity Identification Evaluation*), um processo através do qual a amostra é fracionada e a toxicidade é isolada por tipo de contaminantes (USEPA, 2001). De acordo com os resultados obtidos, as

principais causas da toxicidade foram: sólidos dissolvidos, amônia, metais, oxidantes, compostos voláteis e sólidos suspensos gerados nos processos biológicos de tratamento.

Para prevenir circunstâncias que podem resultar em efluente final tóxico é necessário aperfeiçoar o sistema de tratamento de efluentes, avaliar a biodegradabilidade e toxicidade de produtos químicos usados na fábrica, ter um controle efetivo dos derrames, e fazer um trabalho de conscientização ambiental dos operadores do processo produtivo (ORR *et al.*, 1996 citado por FURLEY *et al.*, 2009).

Uma preocupação mais recente é a presença de disruptores endócrinos dentro dos compostos recalcitrantes encontrados em efluentes de fábricas de polpa kraft branqueada. Um disruptor endócrino pode ser definido como “...uma substância exógena que causa efeitos adversos à saúde em um organismo e, ou sua prole, consequência de uma mudança na função endócrina” (OLSSON *et al.*, 1998). O sistema endócrino é composto por um mecanismo complexo que coordena e regula a comunicação entre células, constituído por combinações de glândulas e hormônios, sendo responsável pelas funções biológicas normais como reprodução, desenvolvimento embrionário, crescimento e metabolismo. As substâncias denominadas disruptores endócrinos são uma recente categoria de contaminantes ambientais que interferem nas funções do sistema endócrino. São também conhecidas como desreguladores ou perturbadores endócrinos.

Os disruptores endócrinos interferem no funcionamento do sistema hormonal mediante um dos três mecanismos seguintes: 1) substituição dos hormônios naturais; 2) bloqueio da ação hormonal; ou 3) aumento ou diminuição dos níveis de hormônios naturais (SANTAMARTA, 2001). A função hormonal mais afetada por estes agentes é o mecanismo de regulação dos esteróides, que determina principalmente as características sexuais e comportamentais das espécies (NOGUEIRA, 2003). Efeitos tais como diminuição na eclosão de ovos de pássaros, peixes e tartarugas, feminização de peixes machos, deformidade em peixes, problemas no sistema reprodutivo em répteis, pássaros e mamíferos, e alterações no sistema imunológico de mamíferos marinhos têm sido associados à

exposição de espécies de animais aos desreguladores endócrinos (CASTRO, 2002; COLEMAN *et al.*, 2005).

Alguns compostos encontrados em efluentes de fábricas de polpa kraft branqueada possuem atividade estrogênica, definida como a capacidade de produção de respostas biológicas qualitativamente similares àquelas produzidas pelo hormônio natural 17β -estradiol (DASTON *et al.*, 1997), responsável pela formação das características femininas, comportamento sexual, ciclo menstrual e ovulação (NOGUEIRA, 2003). A atividade estrogênica detectada em efluentes tratados da indústria de polpa kraft é atribuída à presença de extrativos da madeira, principalmente os fitosteróis lipofílicos (KOSTAMO *et al.*, 2004; HEWITT *et al.*, 2006), sendo os mais importantes nos efluentes de polpa kraft branqueada de eucalipto o β -sitosterol, campesterol e estigmasterol (NIEMINEN, 2002). A atividade dos fitosteróis se deve à similaridade de sua estrutura com a do estrógeno natural estradiol (Figura 1). Uma das maiores evidências da atividade estrogênica são os efeitos reprodutivos em várias espécies de peixes expostos a efluentes de fábricas de polpa kraft branqueada (GILMAN, 2003; HEWITT e MARVIN, 2005). Esses efeitos incluem a diminuição da fertilidade, diminuição do sucesso da incubação de ovos, desmasculinização e feminilização de peixes machos, e desfeminilização e masculinização de peixes fêmeas (FALCONER *et al.*, 2006). Os efeitos são observados em concentrações muito baixas, da ordem de $0,1 \text{ ng.L}^{-1}$.

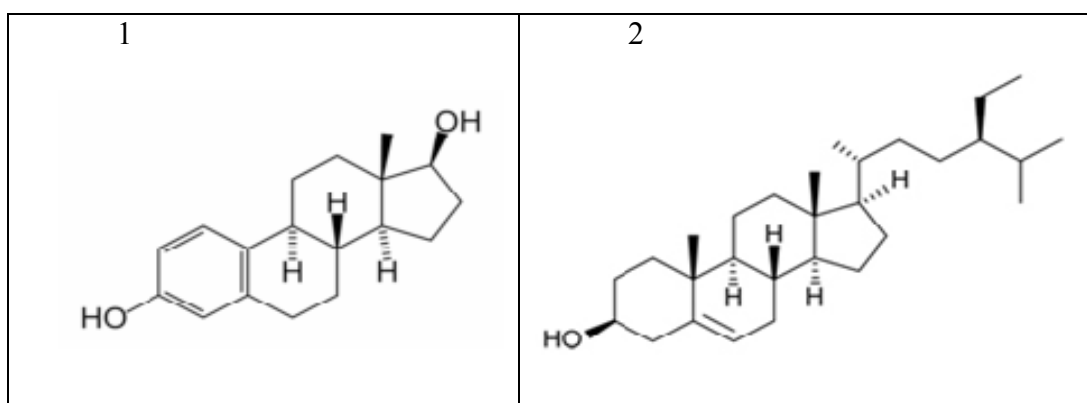


Figura 1 - Estrutura do 17β -estradiol (1) um hormônio natural e do β -sitosterol (2) um extrativo lipofílico da madeira, que apresenta atividade estrogênica.

Em recente pesquisa de 22 efluentes de fábricas de celulose, as concentrações totais de esteróis variaram numa faixa de 71 a 535 mg.L⁻¹, sendo que o β-sitosterol foi o de maior presença em todos os locais amostrados (KOSTAMO e KUKKONEN, 2003). A presença de β-sitosterol foi independente do processo de produção usado, e foi detectado tanto nos efluentes de fábricas que produzem celulose por processos químicos quanto por processos termomecânicos, mesmo após o tratamento biológico dos efluentes (TREMBLAY e VAN DER KRAAK, 1998).

Os efeitos relacionados à presença dos esteróis nos corpos aquáticos assim como os processos de degradação destes compostos estão sendo pesquisados. Sabe-se que o β-sitosterol não apresenta toxicidade aguda a *Daphnia*, mas não se sabe sua resposta em outros testes ecotoxicológicos de curta duração. Kostamo e Kukkonen (2003) relataram que as concentrações de extrativos nos efluentes de celulose após o tratamento biológico ainda permaneciam em níveis que poderiam provocar efeitos crônicos nos organismos do corpo receptor.

Fitosteróis são mais passíveis de serem biotransformados por bactérias do que serem degradados (KOSTAMO e KUKKONEN, 2003). No entanto, foi demonstrado que a adaptação da biomassa no sistema de tratamento pode aumentar a eficiência de degradação de β-sitosterol (BELMONTE *et al.*, 2006). A degradação é mais desejável do que a biotransformação, uma vez que alguns produtos biotransformados podem ainda causar efeitos crônicos, como o decréscimo na capacidade reprodutiva e distúrbios endócrinos que afetam o metabolismo e a reprodução (ORN *et al.*, 2006).

Estudos realizados por Vidal *et al.* (2006) avaliaram a degradação anaeróbia (por meio de um filtro anaeróbio) de esteróis presentes em efluentes de polpa kraft branqueada. Os resultados demonstram que a presença de β-sitosterol ou estigmasterol não alterou a atividade metanogênica das bactérias anaeróbias presentes no meio e que a remoção destes compostos foi de até 80%. Para algumas condições estudadas, a taxa de remoção de β-sitosterol e de estigmasterol foi de 100 e 95%, respectivamente.

Considerando que efluentes de polpa kraft branqueada ainda podem conter substâncias nocivas à vida aquática nos corpos receptores, mesmo após o

tratamento biológico sob condições que atendem à legislação no que tange a eficiência de remoção de parâmetros como DBO e DQO, torna-se necessário avaliar a atividade biológica dos efluentes de fábricas brasileiras, identificar as substâncias responsáveis pela mesma e desenvolver técnicas alternativas para eliminá-la.

3.2.2 – COMPOSTOS DE ALTA E BAIXA MASSA MOLAR

O tamanho molecular dos constituintes do efluente afeta sua tratabilidade biológica porque os compostos precisam ser assimilados em células bacterianas. O transporte passivo de compostos hidrofílicos através de membranas celulares é considerado restrito a compostos com uma massa molar menor que 500 g.mol^{-1} (SONNENBERG e WIMER, 1995).

A fração recalcitrante dos efluentes de branqueamento é caracterizada por compostos de alta massa molar ($> 1 \text{ kg mol}^{-1}$), que não são metabolizados devido ao seu tamanho. Os compostos de alta massa molar são ainda os principais responsáveis pela cor e pelo AOX do efluente (ARCHIBALD e ROY-ARCAND, 1995; KONDURU *et al.*, 2001; BIJAN e MOHSENI, 2004). Já os compostos de baixa massa molar ($< 1 \text{ kg mol}^{-1}$) são os responsáveis pela toxicidade aguda do efluente (ARCHIBALD e ROY-ARCAND, 1995; MOUNTEER *et al.*, 2002).

Em geral, o tratamento biológico não remove a porção biorefratária dos efluentes da indústria de polpa kraft branqueada, que consiste principalmente em compostos de lignina oxidados de alto peso molecular (massa molar $> 1000 \text{ g.mol}^{-1}$) de operações de branqueamento (DAHLMAN *et al.*, 1995). Resultados obtidos por Morais *et al.* (2008) confirmam a maior recalcitrância da matéria orgânica de alta massa molar ao tratamento biológico e indicam que o caminho para a maior eficiência de tratamento consiste na conversão de matéria orgânica de alta massa molar em matéria de baixa massa molar. Neste sentido, têm sido desenvolvidos tratamentos com o objetivo de eliminar a matéria orgânica recalcitrante de alto peso molecular (como também um pouco das de baixo peso molecular). Entre os tratamentos destacam-se os processos oxidativos avançados (POAs), como a ozonização.

Assim, a avaliação da remoção da matéria orgânica de alta e baixa massa molar em sistemas de tratamento de efluentes de indústrias de polpa kraft branqueada pode auxiliar no desenvolvimento de tratamentos mais efetivos na remoção desses compostos. Para isto, torna-se necessário o fracionamento das amostras para separá-las em frações de alta (AMM) e baixa (BMM) massa molar.

3.3 – ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS

A avaliação da qualidade de efluentes não deve se restringir apenas às análises físico-químicas. Devido às exigências dos órgãos ambientais e à necessidade de uma avaliação da toxicidade de águas e efluentes, testes com organismos aquáticos têm sido utilizados mundialmente. Os ensaios fazem parte de programas de monitoramento de qualidade de águas ou de procedimentos para classificação do nível de periculosidade e avaliação de risco de substâncias químicas no ambiente. A mais recente reformulação da legislação federal sobre a qualidade das águas superficiais, a Resolução nº 357 de 17 de março de 2005 do Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA), inclui, pela primeira vez, padrões de toxicidade. Para as águas doces, essas condições de qualidade são:

... a não verificação de efeito tóxico crônico (classes 1 e 2) ou agudo (classe 3) a organismos, de acordo com os critérios estabelecidos pelo órgão ambiental competente, ou, na sua ausência, por instituições nacionais ou internacionais renomadas, comprovado pela realização de ensaio ecotoxicológico padronizado ou outro método cientificamente reconhecido.

A Resolução 357 também estabelece as condições e os padrões de lançamento de efluentes e faz cita especificamente a toxicidade no seu artigo 34:

Art. 34. Os efluentes de qualquer fonte poluidora somente poderão ser lançados, direta ou indiretamente, nos corpos de água desde que obedeçam as condições e padrões previstos neste artigo, resguardadas outras exigências cabíveis:

§ 1º O efluente não deverá causar ou possuir potencial para causar efeitos tóxicos aos organismos aquáticos no corpo receptor, de acordo com os critérios de toxicidade estabelecidos pelo órgão ambiental competente.

§ 2º Os critérios de toxicidade previstos no § 1º devem se basear em resultados de ensaios ecotoxicológicos padronizados, utilizando organismos aquáticos, e realizados no efluente.

A legislação federal não especifica quais ensaios ecotoxicológicos devem ser utilizados, não estabelece valores para a classificação de um efluente como tóxico ou não, e nem aborda a avaliação dos perturbadores endócrinos. No Brasil, apenas os estados de São Paulo e Santa Catarina dispõem de legislação com critérios ecotoxicológicos para regulamentação do lançamento de efluentes líquidos (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2006). No estado de São Paulo, os organismos a serem utilizados nos ensaios, bem como os métodos analíticos são definidos pela Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB) caso a caso (Resolução SMA-3/2000).

Os testes de toxicidade devem ser considerados como uma análise indispensável no controle da poluição hídrica, pois detectam os efeitos dos poluentes sobre a biota, enquanto as análises químicas apenas identificam e quantificam as substâncias presentes nas amostras ambientais (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2006). Os ensaios ecotoxicológicos foram primeiramente realizados com peixes, e os primeiros relatos de uso de tais ensaios datam de 1920. Durante as décadas de 1940 e 1950 aumentaram os trabalhos nesta área, surgiram diferentes métodos de ensaios e os pesquisadores perceberam que diferenças nas condições-teste acarretam diferentes resultados, demonstrando a necessidade de padronização dos testes (SLOOF, 1988 citado por ZAGATTO e BERTOLETTI, 2006).

Atualmente, vários ensaios de toxicidade já estão bem estabelecidos, sendo alguns padronizados nacional e internacionalmente por associações ou organizações de normalização, como a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB), *Association Française de Normalisation* (AFNOR), *American Society for Testing and Materials* (ASTM) e *American Water Works Association* (AWWA).

Os ensaios podem avaliar a toxicidade aguda e a crônica. Os testes de toxicidade aguda envolvem a exposição de curta duração e absorção rápida do

agente tóxico com efeito observado em 24 a 48 h. O efeito avaliado é a mortalidade ou a imobilização do organismo-teste. Os testes de toxicidade crônica envolvem exposições repetidas durante uma parte relativamente grande do ciclo de vida do organismo-teste (pelo menos um décimo da vida) até os sintomas se manifestarem. Diversos efeitos podem ser avaliados, incluindo: necrose (anatomia/patologia), ganho de peso, crescimento, respostas fisiológicas (função hepática, respiração), respostas bioquímicas (inibição/indução de enzimas), fertilidade e desenvolvimento de fetos (ADAMS, 1995).

Depois de detectada a toxicidade em um efluente deve se determinar sua fonte, o que nem sempre é tarefa fácil em misturas complexas, como os efluentes industriais. Para ajudar nesse trabalho a Agência de Proteção Ambiental dos EUA desenvolveu um programa de identificação/redução de toxicidade (USEPA, 1991, 1992). Este processo de identificação da toxicidade também é conhecido como TIE (*Toxicity Identification Evaluation*).

Na primeira fase do programa, a atividade biológica é monitorada, antes e após uma série de manipulações físicas e químicas do efluente, para caracterizar a natureza química das substâncias tóxicas. Dessa forma, é possível determinar se a atividade biológica se deve, por exemplo, a metais catiônicos, compostos voláteis, compostos apolares, amônia, agentes oxidantes, etc. Após determinar a natureza química das substâncias tóxicas ao longo do período de avaliação, passa-se para a segunda fase do programa. Nessa segunda fase pode-se optar, ou por fazer uma identificação mais refinada das substâncias responsáveis, ou por realizar estudos de tratabilidade para remover essas substâncias antes do lançamento do efluente no corpo receptor.

3.3.1 – ORGANISMOS TESTE

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

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

Os microcrustáceos *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia dubia* são organismos-teste de ampla utilização no que diz respeito à avaliação ecotoxicológica de efluentes pelo fato de serem sensíveis a diversos compostos e assim possibilitarem a obtenção de resultados precisos. Os microcrustáceos em geral desempenham um papel importante na cadeia alimentar, pois são consumidores primários, alimentam-se de algas e servem de alimento para os consumidores secundários, como peixes e outros vertebrados. Assim sendo, mudanças no comportamento destes organismos podem interferir os outros níveis tróficos do ecossistema aquático (ALLAN, 1976; CETESB, 1999). Outros pontos positivos no que diz respeito ao uso destes microrganismos são a possibilidade de cultivo em laboratório, ciclo de vida curto, facilidade na manutenção das culturas, disponibilidade dos organismos nas diferentes épocas do ano e facilidade na obtenção de lotes uniformes de organismos.

A alga *Pseudokirchneriella subcapitata* é bastante empregada para testes ecotoxicológicos crônicos. O ensaio realizado com a alga consiste em um teste estático no qual não há renovação das soluções teste ao longo do período de exposição. A grande vantagem da utilização deste organismo nos testes de toxicidade é que a alga é um produtor primário e assim como os microcrustáceos, desempenha um papel importante na cadeia alimentar e pode interferir nos outros níveis tróficos. A referida alga também é considerada uma das mais adequadas para a alimentação dos microcrustáceos *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia dubia*. (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2006).

3.3.2 – APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

Para apresentação dos resultados dos testes de toxicidade são utilizadas análises estatísticas. O objetivo principal é determinar a concentração do agente químico que causa (ou não) efeito sobre uma população de organismos-teste.

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

Em ensaios de toxicidade crônica, o objetivo é definir, entre as concentrações utilizadas, aquela em que não são detectados efeitos de importância biológica sobre a variável de interesse (sobrevivência, reprodução, crescimento, etc.) (CAPIZZI *et al.*, 1985 citado por ZAGATTO e BERTOLETTI, 2006). Tal concentração corresponde a CENO, a maior concentração de efeito não observado. Também se quantifica a CEO, a menor concentração que causa efeito estatisticamente significativo em relação ao controle e o VC (valor crônico), que é a média geométrica da CEO e CENO. A toxicidade crônica também pode ser expressa como a CI_{25} , que representa a concentração da amostra estudada que reduz em 25% o crescimento do organismo teste.

3.4 – ATIVIDADE ESTROGÊNICA

Muitos países já englobam a questão dos disruptores endócrinos em sua legislação e estabelecem tratamentos visando a remoção destes compostos. No Brasil ainda há necessidade da realização de novas pesquisas para identificação e quantificação de substâncias conhecidas como disruptores endócrinos nos corpos d' água e desenvolvimento de técnicas alternativas para que possam ser removidas, garantindo a qualidade da água de forma a não causar efeitos negativos à comunidade aquática e à população que faz uso desta.

Para a determinação de atividade estrogênica, diferentes métodos analíticos são reportados na literatura, os quais primeiramente foram válidos para

matrizes biológicas como sangue, tecido e urina, sendo que algumas modificações nestes métodos podem ser suficientes para amostras ambientais (BILA, 2005). Entre os métodos existentes têm-se as análises químicas e os ensaios *in vivo* e *in vitro*. Os ensaios *in vivo* e *in vitro* foram desenvolvidos para analisar os efeitos causados por substâncias presentes no meio ambiente suspeitas ou confirmadas como disruptores endócrinos. Os ensaios *in vivo* avaliam vários parâmetros, como massa de órgãos sexuais, diferenciação celular, expressão de proteínas e atividade enzimática (GRAY Jr. *et al.*, 1998; BAKER, 2001). Os ensaios *in vitro* são baseados em mecanismos de ação que causam respostas mais específicas, sendo possível avaliar apenas alguns parâmetros em cada teste.

Os ensaios *in vivo* apresentam como vantagens permitir determinar os mecanismos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (BIRKETT e LESTER, 2003). Apesar de serem largamente utilizados, geralmente são inadequados para avaliação em larga escala, uma vez que são de alto custo, mais trabalhosos e requerem mais tempo para análise, em relação aos ensaios *in vitro* (GRAY Jr. *et al.*, 1998). Os ensaios *in vitro* têm como vantagens: sensibilidade a baixas concentrações, respostas específicas, custo baixo, necessidade de pouca quantidade de amostra, adequados para misturas complexas (águas naturais, efluentes, lodos biológicos, etc).

Os ensaios *in vivo* mais comuns são: ensaio que avalia o nível de vitelogenina (VTG) no plasma de peixes e ensaio uterotrófico em roedores. A VTG é uma proteína que desempenha um importante papel no sistema reprodutivo de vertebrados ovíparos fêmeas. É sintetizada no fígado, regulada por estrogênio e transportada através do sangue para os ovários, onde será incorporada no desenvolvimento dos óvulos (BAKER, 2001). Peixes machos, quando expostos a substâncias estrogênicas são capazes de produzir uma grande quantidade de VTG, similar às fêmeas. O ensaio uterotrófico se baseia em determinar alterações do peso uterino em roedores.

Entre os métodos *in vitro* mais utilizados estão o ensaio YES (“Yeast Estrogen Screen”) e o ensaio MCF-7. O ensaio MCF-7 baseia-se na proliferação de culturas de células cancerígenas mamárias humanas MCF-7 induzidas pela exposição à substância estrogênica. O ensaio YES, desenvolvido por Routledge e

Sumpter (1996), utiliza a levedura *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada, pela inserção do gene que codifica o REh no principal cromossomo e de um plasmídeo contendo o gene repórter *lacZ* que codifica a β -galactosidase e cuja região promotora tem alta afinidade por sequências específicas do DNA conhecidas como elementos de resposta estrogênica (ERE). Disruptores endócrinos que possuem atividade estrogênica formam um complexo com o receptor (REh), e esse complexo se liga à região promotora da *lacZ*, promovendo a síntese da enzima β -galactosidase (β -gal). Quando a β -gal é excretada ela pode clivar o substrato cromogênico CPRG (clorofenol vermelho- β -D-galactopiranosida) presente no meio, para formar um produto vermelho. A mudança da coloração inicial amarela do CPRG para vermelha sinaliza uma resposta positiva (Figura 2). A intensidade da cor vermelha é proporcional à quantidade de β -gal excretada, que, por sua vez, é proporcional e à quantidade do complexo disruptor-receptor formada.

Este ensaio mede a atividade estrogênica total de uma amostra, negligenciando quais compostos são responsáveis por essa atividade. A atividade estrogênica total na amostra é então comparada com a atividade do estrogênio endógeno 17β -estradiol, e pode ser expressa como equivalentes de estradiol (EQ-E2) (FERREIRA, 2008). Quanto maior a concentração equivalente de estradiol, maior a atividade estrogênica da amostra.

O ensaio YES é prático e altamente sensível e pode detectar concentrações baixas de 17β -estradiol, na ordem de ng.L^{-1} (ROUTLEDE e SUMPTER, 1996). Este ensaio é realizado em microplacas de 96 poços, o que permite a análise de múltiplas amostras em uma larga faixa de concentrações e o resultado pode ser obtido após três dias. Os resultados podem ser visualizados a olho nu com uma mudança de coloração do meio. Segundo os resultados obtidos por Routledge e Sumpter (1996), o ensaio de YES mostrou-se ser altamente específico, reprodutivo e rápido, permitindo seu uso como análise rotineira para avaliar a atividade estrogênica de substâncias químicas e amostras ambientais.

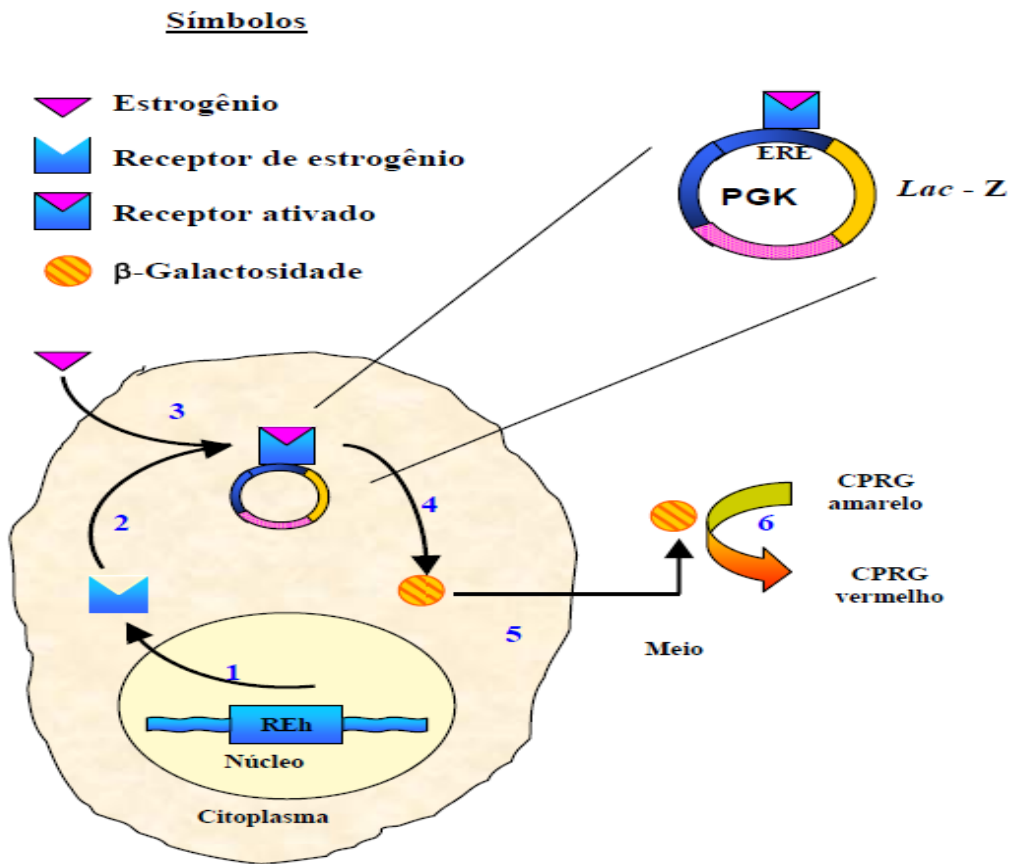


Figura 2 - Esquema do sistema de expressão do estrogênio induzível na levedura *Saccharomyces cerevisiae*. O gene receptor de estrogênio humano (REh) é integrado no genoma principal e é expresso (1) na forma capaz de acoplar-se aos elementos de resposta estrogênica (ERE) dentro da região promotora do gene plasmidial *lacZ* (2). A ativação do receptor (3), pela ligação do ligante, causa expressão do *lacZ* (4) o qual produz a enzima β -galactosidase. Esta enzima é excretada no meio (5) e cliva o substrato cromogênico CPRG (amarelo), para formar um produto vermelho (6), que pode ser medido pela absorvância a 540 nm (ROUTLEDGE e SUMPTER, 1996).

3.5 – OZONIZAÇÃO

3.5.1 – OZÔNIO

Desde o início do século o ozônio vem sendo utilizado em plantas de tratamento de água, principalmente como desinfetante para inativação de bactérias presentes na água. Atualmente, devido ao seu alto poder de oxidação, o ozônio vem sendo utilizado em plantas de tratamento de água e efluentes em várias partes do mundo visando à oxidação e dissociação de compostos orgânicos não biodegradáveis.

A decomposição do ozônio pode ser acelerada pelo aumento do pH, pela adição de peróxido de hidrogênio ou por luz UV (von GUNTEN, 2003; ALMEIDA *et al.*, 2004). Desta maneira, a oxidação de compostos orgânicos durante a ozonização pode ocorrer via ozônio molecular (reação direta - predominante em meio ácido) ou radical hidroxila (reação indireta - predominante em meio básico). Em pH neutro, ambos oxidantes podem estar presentes.

Apesar do radical hidroxila ser o agente oxidante mais forte, o ozônio, por ser um oxidante muito seletivo, pode ser mais eficiente na degradação de compostos recalcitrantes. Sua seletividade pode permitir que o tratamento seja realizado com baixas doses de ozônio, ao passo que os oxidantes mais reativos (radicais $\bullet\text{OH}$) podem ser largamente consumidos nos processos oxidativos (BILA, 2005).

A ozonização também depende do processo de geração do ozônio. O ozônio é um gás incolor a temperatura ambiente e a sua molécula é consideravelmente instável. Desta forma, o ozônio não pode ser armazenado ou transportado como outros gases, uma vez que, quando acondicionado em recipientes, ele decai continuamente até que reste somente o oxigênio. Portanto, ele só pode ser produzido no local e no momento a ser consumido (*in situ*), a partir do oxigênio puro ou de misturas gasosas que contenham oxigênio, como o ar. Entre as técnicas mais importantes para geração de ozônio estão: descarga elétrica, eletrólise e radiação química, sendo a descarga elétrica o método de geração mais utilizado. Neste processo o ozônio é gerado pela passagem de um gás contendo oxigênio (ar sintético, oxigênio puro, ou outras misturas com

oxigênio) através de uma descarga corona ou através de uma fonte de radiação UV (ALMEIDA *et al.*, 2004).

3.5.2 – USO DA OZONIZAÇÃO NO TRATAMENTO DE EFLUENTES DE CELULOSE

Nas últimas décadas tem crescido o uso do ozônio em plantas de tratamento de efluentes industriais devido, principalmente, à necessidade de produzir efluente com alta qualidade e que atenda aos padrões de descarte cada vez mais exigentes. A ozonização tem sido estudada para o tratamento de efluentes de celulose e papel (efluentes de branqueamento, totais primários e secundários), de indústrias têxteis, de produção farmacêutica, entre outras. O primeiro estudo da ozonização de efluentes de celulose e papel foi realizado na década de 1970 (BAUMAN, 1974; MELNYK *et al.*, 1977).

Embora seja a forma mais econômica de remover a carga orgânica de efluentes, o tratamento biológico não é capaz de remover compostos recalcitrantes. Esses processos são capazes de reduzir a DBO em 85-95%, mas a DQO em apenas 40-80% (THOMPSON *et al.*, 2001; MOUNTEER *et al.*, 2007), devido à presença de substâncias recalcitrantes. Os tratamentos biológicos convencionais também são pouco eficientes na remoção de cor e, em muitos casos, o efluente tratado pode apresentar uma coloração mais acentuada (GARG e MODI, 1999). A eficiência de remoção de AOX no tratamento biológico aeróbio de efluentes de celulose varia de 10 a 60%. Há evidências que uma parte da remoção de AOX resulta apenas da adsorção à biomassa presente, e não da mineralização dos compostos organoclorados (HALL e RANDLE, 1992).

A ozonização do efluente de celulose branqueada é uma tecnologia bastante eficiente na remoção de cor, fenóis totais e outros compostos recalcitrantes, além da toxicidade (ALMEIDA *et al.*, 2004). É indiscutível que ocorre alguma alteração na estrutura química dos compostos, uma vez que o aumento de biodegradabilidade é observado. Além disso, o ozônio é capaz de converter compostos de alto peso molecular em ácidos orgânicos de baixa massa molar (FREIRE *et al.*, 2000).

Várias substâncias químicas podem ser oxidadas pelo ozônio nas plantas de tratamento de efluentes. O processo de tratamento com ozônio pode ter custos altíssimos quando desenvolvido para alcançar altas eficiências de mineralização completa de poluentes orgânicos. Entretanto, baixas doses de ozônio podem ser suficientes para transformar compostos biorefratários em compostos biodegradáveis, que podem ser removidos em tratamento biológico posterior (BAIG e LIECHTI, 2001).

O ozônio foi primeiro aplicado em tratamento terciário de efluentes de fábrica de celulose para melhorar a qualidade do efluente final (HOSTACHY *et al.*, 1997), mas seu uso em pré-tratamento para aumentar a biodegradabilidade do efluente e melhorar a eficiência do tratamento biológico tem sido investigado mais recentemente (MANSILLA *et al.*, 1997; BIJAN e MOHSENI, 2004; MOUNTEER e MOKFIENSKI, 2005; MORAIS *et al.*, 2008). No pré-tratamento, o objetivo da ozonização é apenas degradar parcialmente a matéria orgânica recalcitrante. As vantagens da aplicação de ozônio nesta etapa relacionam-se à melhoria da biodegradabilidade do efluente antes do tratamento biológico, resultando em melhoria da eficiência do tratamento (MOUNTEER e MOKFIENSKI, 2005). Para a aplicação após o tratamento biológico, além da biodegradabilidade dos efluentes ser melhorada, o reúso dos efluentes tratados também é possível (KREETACHAT *et al.*, 2007).

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 – EFLUENTES

Para o estudo foram coletados efluentes primário e secundário no sistema de lodos ativados de uma fábrica brasileira de polpa kraft branqueada de eucalipto.

O efluente geral da fábrica (proveniente do cozimento da madeira, lavagem e depuração da polpa, branqueamento e evaporação do licor negro), após passar pelo tratamento preliminar e primário, é resfriado e segue para correção de pH e adição de nutrientes, sendo então enviado para o sistema de lodos ativados. As amostras de efluentes foram coletadas na entrada do tanque de aeração (efluente primário) e na saída do decantador secundário (efluente secundário) do sistema de lodos ativados. As amostras foram enviadas à Universidade Federal de Viçosa (UFV), onde foram acondicionados sob atmosfera de nitrogênio e estocados em câmara fria a -4°C até seu uso. As coletas foram realizadas bimestralmente durante 10 meses de monitoramento, perfazendo um total de cinco amostras.

4.2 – PLANO EXPERIMENTAL

Os efluentes primário e secundário foram caracterizados quanto às características físico-químicas e atividade biológica, para verificar o impacto do tratamento biológico sobre as mesmas.

O efluente secundário foi submetido a um estudo de identificação de toxicidade (TIE) e também tratado com ozônio para avaliar o impacto do ozônio sobre a atividade biológica. Além disso, avaliou-se o efeito da diluição no corpo receptor para verificar se poderiam ser esperados efeitos tóxicos após o lançamento do efluente. Um resumo do plano experimental está apresentado na Figura 3.

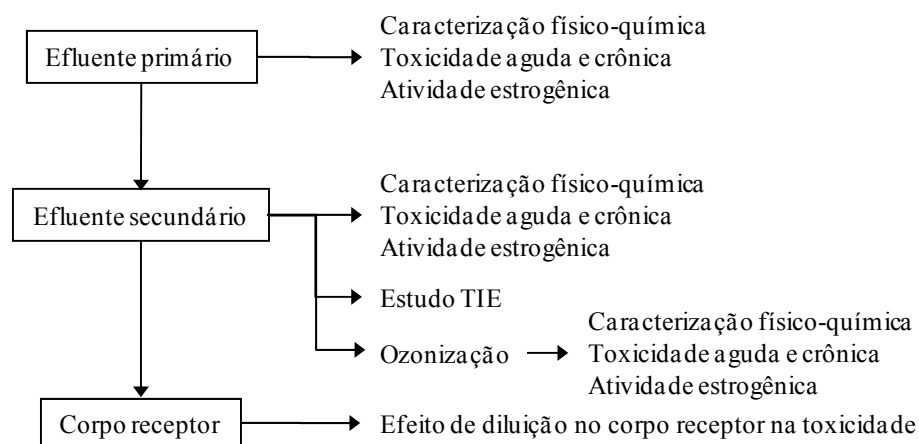


Figura 3 - Resumo do plano experimental.

4.3 – FRACIONAMENTO DO EFLUENTES EM AMM E BMM

Os efluentes primário e secundário foram separados em frações de alta massa molar (AMM) e baixa massa molar (BMM), em uma célula de ultrafiltração (Amicon 8200, Millipore, Billerica, EUA), equipada com membrana de limite de exclusão molecular de 500 g.mol^{-1} (Amicon YC05, Millipore). Após o fracionamento, as frações dos efluentes separadas por massa molar foram reconstituídas aos seus volumes originais com água destilada e, então, submetidas às análises físico-químicas e ensaios toxicológicos, com objetivo principal de se avaliar a toxicidade dos compostos de alta e baixa massa molar.

4.4 - CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS EFLUENTES

Os parâmetros físico-químicos de caracterização dos efluentes foram realizados por métodos padronizados dispostos no “Standard Methods” (APHA, 1998), exceto onde indicado. Os parâmetros quantificados foram:

- Demanda Química de Oxigênio (DQO): Método colorimétrico a 600 nm após refluxo fechado. A DQO se relaciona com a quantidade de matéria orgânica susceptível à oxidação, em meio ácido, por um forte oxidante químico, o dicromato, sendo o dicromato consumido expresso em oxigênio equivalente.
- Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO_5): Método Winkler modificado pela azida. A DBO_5 se relaciona com a quantidade de matéria orgânica

biodegradável presente em uma amostra. A degradação oxidativa da matéria orgânica é realizada por microrganismos aeróbios, que consomem o oxigênio presente na amostra durante um período de cinco dias, à temperatura de 20°C.

- Carbono Orgânico Total (COT): Quantificado em analisador automático (Shimadzu TOC 5000, Tóquio, Japão), através da combustão da amostra e medição do CO₂ resultante.
- Halógenos Orgânicos Adsorvíveis (AOX): Quantificados pela adsorção em carvão ativado e subsequente combustão e titulação dos íons de cloreto gerados, utilizando um analisador automático (Euroglas 1600, Delft, Holanda). O AOX é uma medida aproximada do material organoclorado presente no efluente.
- pH: Medições em pHmetro (Digimed DR20, São Paulo) previamente calibrado com soluções padrão.
- Lignina: Analisada pela reação com os reagentes Folin-fenol e carbonato-tartarato, seguido de leitura a 700 nm em espectrofotômetro (Hach DR2800, São Paulo). Os resultados são expressos como mg fenol/L.
- Cor: Analisada na amostra filtrada (membrana AP40, Millipore) com pH ajustado a 7,6, seguido da leitura da absorbância a 465 nm, sendo expressa como mg Pt/L.
- Carboidratos: Utilizou-se a metodologia proposta por Blundi e Gadelha (2001), que consiste na adição de fenol e de ácido sulfúrico concentrado, os quais reagem com carboidratos para formar um produto de cor laranja, sendo a absorbância lida a 488 nm em espectrofotômetro (Hach DR2800, São Paulo, Brasil). Os resultados são expressos como mg glicose/L.

Todas as análises dos parâmetros descritos acima foram realizadas em triplicata no Laboratório de Controle de Qualidade da Água, da Divisão de Água e Esgoto da UFV (LCQA/UFV), exceto o AOX e COT, que foram analisados no Laboratório de Celulose e Papel do Departamento de Engenharia Florestal da UFV (LCP/UFV).

4.5 – ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS

Os ensaios ecotoxicológicos foram realizados na sala de Ecotoxicologia Aquática do LCQA/UFV.

4.5.1 – TOXICIDADE AGUDA

A toxicidade aguda foi avaliada em teste estático de 48 h, com avaliação da sobrevivência do microcrustáceo *Daphnia similis*, seguindo a norma da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, NBR 12713/2004). Foram preparadas soluções teste nas concentrações de 6,25%, 12,5%, 25%, 50%, 75% e 100% do efluente e uma solução controle contendo apenas água de diluição. Quatro alíquotas de 30 mL de cada concentração e do controle foram transferidas para recipientes plásticos com 50 mL de capacidade e cinco neonatos (de 6 a 24 h de idade) de *D. similis* foram colocados em cada recipiente, perfazendo um total de vinte organismos expostos para cada concentração. As soluções foram mantidas a 22°C, sob fotoperíodo de 12h luz/12h escuro. Ao término das 48 horas de exposição, foi feita uma contagem dos organismos imobilizados (mortos) em cada solução teste. Após verificar a normalidade e homocedasticidade dos dados, determinou-se a CL₅₀ 48 horas e seu intervalo de confiança, com auxílio do programa computacional Probit (USEPA, 2002a).

4.5.2 – TOXICIDADE CRÔNICA

A toxicidade crônica foi avaliada com dois organismos-teste: o microcrustáceo *Ceriodaphnia dubia* e a alga verde *Pseudokirchneriella subcapitata*, de acordo com as normas ABNT NBR13373/2006 e NBR12648/2005, respectivamente.

Foram realizados testes semi-estáticos, com duração de oito dias, da avaliação da sobrevivência e reprodução do microcrustáceo *C. dubia*. Soluções teste nas concentrações de 6,25%, 12,5%, 25%, 50%, 75% e 100% do efluente e uma solução controle contendo apenas água de diluição e alimento foram preparadas. Uma fêmea de *C. dubia* (6 a 24 horas de idade) foi transferida para cada uma das dez réplicas de 15 mL das soluções-teste e do controle. Essas foram incubadas a 22°C, sob fotoperíodo de 12h luz/12h escuro. De três em três dias, as

fêmeas originais foram transferidas para novos recipientes contendo as soluções-teste e alimento e os números de fêmeas adultas sobreviventes e de jovens por fêmea registrados. No final do período do teste, foi verificada a existência de diferença significativa entre os dados de sobrevivência dos organismos em cada solução-teste com os do controle. Não havendo diferença significativa em termos de sobrevivência, foi verificada a existência de diferença significativa na reprodução em relação ao controle. Os valores de CENO e CEO para a reprodução foram estimados com o auxílio do programa Dunnett (USEPA, 2002b). O valor crônico foi calculado como a média geométrica da CENO e CEO. Os resultados também foram expressos como CI_{25} , ou seja, a concentração do efluente que reduziu em 25% o crescimento do microcrustáceo em relação ao controle. O CI_{25} foi estimado com auxílio do programa ICPin (USEPA, 2002b).

A toxicidade crônica a *Pseudokirchneriella subcapitata* foi determinada em teste estático de inibição do crescimento, com duração de 96 h. Foram preparadas soluções teste nas concentrações de 12,5%, 25%, 50%, 75% e 100% do efluente e uma solução controle contendo apenas meio de cultivo da alga. Três réplicas de 50 mL de cada solução teste e do controle foram inoculadas com uma suspensão da cultura de *P. subcapitata* para obter uma concentração inicial de 10^4 células/mL. Essas soluções foram incubadas a 22°C sob iluminação contínua por 96h. No início e no final do teste, a absorbância a 750 nm (A_{750}) de cada réplica foi lida (espectrofotômetro HACH DR2800). A biomassa foi quantificada através da construção de uma curva padrão, a qual relacionou a concentração da suspensão de células e a A_{750} . Os resultados foram expressos como CI_{25} , ou seja, a concentração do efluente que reduziu em 25% o crescimento das algas em relação ao controle, bem como CENO e CEO, calculados pelos programas ICPin e Dunnet, respectivamente (USEPA, 2002b). O programa Dunnett forneceu ainda a “diferença do controle”, o valor da diferença na reprodução em relação ao controle que foi considerada significativa (um valor negativo indica que a reprodução foi menor quando comparada ao controle).

4.5.3 – AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO EFLUENTE NO CORPO RECEPTOR

Para avaliar a toxicidade do efluente deve-se considerar que no lançamento do efluente no corpo receptor ainda haverá uma diluição, que pode ser suficiente para que o efeito tóxico seja eliminado nos organismos aquáticos. A avaliação da toxicidade do efluente no corpo receptor foi estimada segundo os critérios do Estado São Paulo, uma vez que o Estado Minas Gerais ainda não possui uma legislação específica. No estado de São Paulo foi instituído o controle ecotoxicológico de efluentes líquidos por meio da publicação da Resolução SMA-03/2000 (São Paulo, 2000). Nesta Resolução, deve se calcular a diluição do efluente no corpo receptor, por meio da equação 3.1:

$$D.E.R = \frac{\text{vazão média do efluente} \times 100}{\text{vazão média do efluente} + \text{vazão de referência do corpo receptor} (Q_{7,10})} \quad (3.1)$$

e a toxicidade permissível do efluente por meio da equação 3.2:

$$D.E.R \leq \frac{CE_{50} \text{ ou } CL_{50}}{100} \text{ ou } D.E.R \leq \frac{CEN0}{10} \quad (3.2)$$

onde:

D.E.R = diluição do efluente no corpo receptor (%);

CE₅₀ = concentração do efluente que causa efeito agudo a 50% dos organismos aquáticos em determinado período de exposição (%);

CL₅₀ = concentração do efluente que causa efeito agudo (letalidade) a 50% dos organismos aquáticos em determinado período de exposição (%);

CEN0 = maior concentração do efluente que não causa efeito crônico observável em determinado período de exposição (%).

Desta forma é possível determinar a toxicidade do efluente após o lançamento no corpo receptor. Em muitos casos, mesmo que seja verificado efeito tóxico do efluente (agudo ou crônico), após o lançamento esse efeito não é mais observado.

4.6 – ENSAIO YES

O procedimento foi realizado de acordo com a metodologia de ROUTLEDGE e SUMPTER (1996), com algumas modificações. As análises foram realizadas no Laboratório de Controle de Qualidade da Água, da Divisão de Água e Esgoto da UFV (LCQA/UFV) e também foram utilizados alguns aparelhos no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Biologia da UFV, entre eles o leitor de microplacas.

A cepa de *Saccharomyces cerevisiae* utilizada no ensaio YES foi doada pelo Prof. J. P. Sumpter da Universidade de Brunel, Uxbrige, UK. Uma amostra dessa cepa foi obtida pelo Laboratório de Poluição das Águas na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e cedida para as pesquisas realizadas na UFV. A cepa de levedura acondicionada e trazida no meio de crescimento fresco foi mantida no laboratório em temperatura ambiente e replicada para ser utilizada nos ensaios. O cultivo da cepa foi realizado segundo a metodologia desenvolvida por Routledge e Sumpter (1996), descrita no Anexo A.

4.6.1 – PROCEDIMENTO DE ANÁLISE

As análises foram realizadas em microplacas estéreis de 96 poços e preparadas em uma capela de fluxo laminar. Os resultados foram expressos em equivalentes de estradiol (EQ-E2).

Para realização do teste foram usadas duas placas de 96 poços: uma placa onde foram feitas as diluições seriais e a placa de análise (ou placa de ensaio). Primeiramente foram feitas diluições seriais (1/2) de 17 β -estradiol (curva padrão) em etanol absoluto, na placa de diluição. As diluições seriais da curva padrão foram feitas a partir de uma solução estoque de 17 β -estradiol de 54,48 $\mu\text{g.L}^{-1}$ em etanol absoluto e as concentrações da curva padrão variaram de 54,48 $\mu\text{g.L}^{-1}$ a 26,61 ng.L^{-1} . Diluições seriais (1/2) das amostras (efluente) também foram preparadas em etanol absoluto, com concentrações variando de 100 a 0,39%. Para cada placa de análise foi construída uma nova curva padrão de 17 β -estradiol.

Após a preparação das diluições seriais, transferiu-se 10 μL de cada poço da placa de diluição para o poço correspondente da placa de ensaio e, em seguida, adicionou-se 200 μL do meio de análise (composto de meio de crescimento

fresco, levedura e CPRG) a cada poço da placa de ensaio. Um esquema do procedimento de análise é mostrado na Figura 4.

Cada placa continha duas fileiras para cada amostra (duplicatas das diluições seriais 1/2 dos efluentes), intercaladas com fileiras do branco (200 μ L de meio de análise e 10 μ L do solvente etanol) e duas fileiras contendo a curva padrão de 17 β -estradiol, também intercaladas com fileiras do branco.

Após adicionar as amostras e controles, as microplacas foram seladas com fita crepe, agitadas por 5 min em um agitador (modelo CERTOMAT II, B, Braun Biotech International, Darmstadt, Alemanha), e incubadas por 3 dias a 30°C em uma estufa (Nova Ética, São Paulo, Brasil).

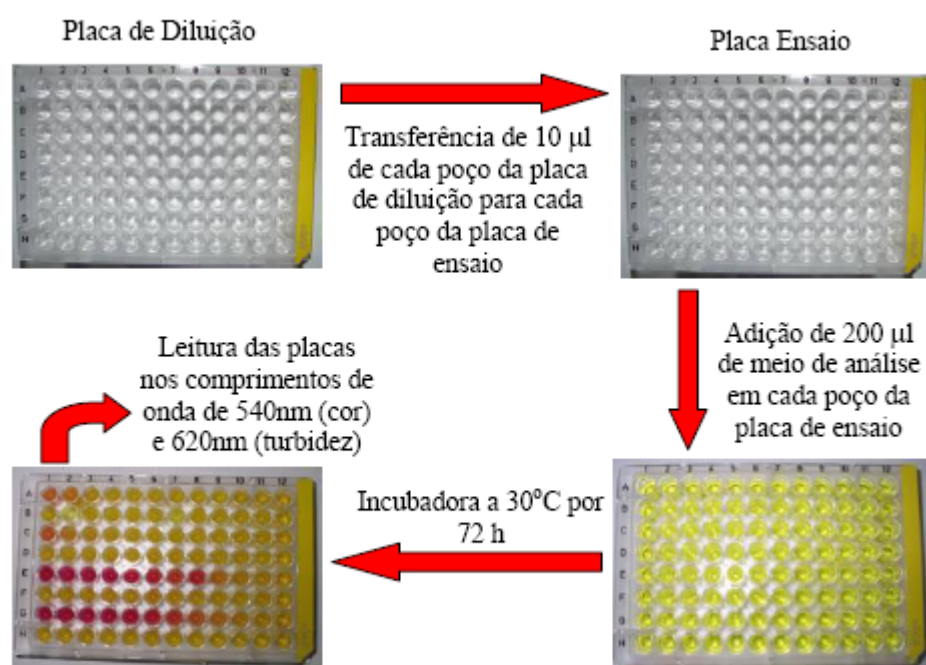


Figura 4 - Esquema do procedimento de análise do ensaio YES

Adaptado de BILA, 2005.

Após a incubação, as microplacas foram novamente agitadas e mantidas em repouso por um período de uma hora, depois do qual a absorvância foi lida a 540 nm (A_{540}) e a densidade ótica a 650 nm (DO_{650}), em leitor de microplacas de 96 poços (THERMO Max, Porto Alegre, Brasil). O crescimento da levedura foi acompanhado pelo aumento da DO_{650} e a atividade estrogênica pela mudança da cor amarela (não apresenta atividade) para rosa (apresenta atividade). A reposta

estrogênica de cada amostra foi corrigida para a turbidez causada pelo crescimento da levedura, aplicando a Equação 3.3.

$$A_{\text{corr}} = A_{540\text{Amostra}} - (\text{DO}_{650\text{Amostra}} - \text{DO}_{650\text{Branco}}) \quad (3.3)$$

onde:

A_{corr} = absorvância corrigida da amostra;

$A_{540\text{Amostra}}$ = absorvância da amostra a 540 nm;

$\text{DO}_{650\text{Amostra}}$ = densidade ótica da amostra a 650nm;

$\text{DO}_{650\text{Branco}}$ = densidade ótica do controle negativo a 650nm (lida nos 2 poços imediatamente abaixo dos dois poços contendo a amostra/padrão).

4.6.2 – CURVA PADRÃO

A curva padrão foi construída a partir dos valores das absorvâncias corrigidas e das concentrações de 17 β -estradiol, pelo programa Origin (OriginLab, Northampton, USA). A curva dose-resposta apresenta a forma sigmoideal, descrita pela equação 3.4, e ilustrada na Figura 5, para a função logística, a forma mais comum da curva sigmoideal.

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^p} + A_2 \quad (3.4)$$

onde:

y = valor de A_{corr} ;

A_1 = máxima indução da atividade estrogênica;

A_2 = limite de detecção;

x = concentração da substância estrogênica no ensaio;

x_0 = concentração que corresponde a resposta igual à metade da diferença entre A_1 e A_2 ;

p = inclinação da região mediana da curva como estimado de uma regressão linear/log da parte linear da curva.

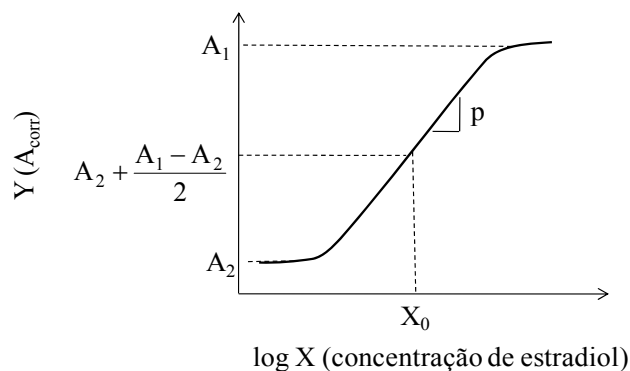


Figura 5 - Representação dos 4 parâmetros da equação 3.4 (A_1 , A_2 , X_0 , p) que descrevem a curva sigmoideal.

Utilizando os valores dos parâmetros da regressão não linear da curva padrão (A_1 , A_2 , X_0 e p), determinou-se a concentração equivalente de 17β -estradiol (EQ-E2) na amostra, por meio da equação 3.4.

4.7 – ESTUDO DA IDENTIFICAÇÃO DA TOXICIDADE

O estudo de identificação de toxicidade foi realizado de acordo com os procedimentos do programa de caracterização da toxicidade (USEPA, 1991, 1992), com algumas modificações para adequação às condições existentes no LCQA/UFV. Após cada manipulação, foram realizados os ensaios toxicológicos para identificação da natureza dos compostos responsáveis pela toxicidade. Um resumo das principais manipulações dos efluentes e seus objetivos segue.

4.7.1. AJUSTE DE PH

A modificação de pH pode afetar a solubilidade, polaridade, volatilidade, estabilidade e especiação de substâncias, afetando assim sua biodisponibilidade e toxicidade. O pH de 1 L de amostra foi ajustado de forma a se obter um meio ácido (pH=3) utilizando ácido clorídrico - HCl 0,1N e também um meio básico (pH=11) com a adição de hidróxido de sódio - NaOH 0,1N. O manual elaborado pela USEPA recomenda realizar o ajuste de pH também usando HCl 1 e 0,01N e NaOH 1 e 0,01N, para verificar o efeito sobre a toxicidade. Em estudo inicial, foi verificado que a concentração do ácido/álcali utilizado para realizar o ajuste não

afetou os resultados dos testes de toxicidade, e, portanto, os ajustes de pH foram realizados apenas com as concentrações de 0,1N de ácido e base.

4.7.2. FILTRAÇÃO

A filtração foi realizada para determinar se a toxicidade se deve a sólidos dissolvidos ou partículas em suspensão. A filtração foi realizada com o efluente em seu pH inicial utilizando membrana de fibra de vidro (Millipore AP40, Billerica, EUA). Cerca de 1 L de efluente passou por um sistema de filtração a vácuo e o filtrado foi coletado para realização dos ensaios de toxicidade.

4.7.3. AERAÇÃO

A aeração tem como objetivo principal determinar se a toxicidade se deve a compostos voláteis e, ou oxidáveis. Como especificado no procedimento descrito pelo manual da EPA, uma alíquota de 35 mL de efluente, em seu pH inicial, foi moderadamente aerada (aproximadamente 500 ml de ar/min) durante um período de 1 hora. Após a aeração foram realizados os ensaios.

4.7.4. EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA

A extração em fase sólida foi realizada para determinar se a toxicidade se deve a compostos orgânicos ou metais complexados apolares. O processo consiste na percolação da amostra através de uma coluna contendo um adsorvente, que retém componentes apolares. Em seguida, esses componentes são eluídos com solvente apropriado.

Para a extração foram usados cartuchos de fase-reversa C₁₈ (500 mg x 3 mL) obtidos da Strata C-18E (Phenomenex, São Paulo). Antes de passar pelo processo de extração, as amostras foram filtradas em membrana de fibra de vidro (Millipore AP40).

O cartucho foi previamente adaptado ao sistema de filtração a vácuo e ativado, passando-se 10 mL de metanol 100%, seguidos de 10 mL de água desmineralizada (“Mili Q”). O metanol e a água foram então descartados. Usando um tubo teflon e adaptadores, a garrafa de vidro contendo a amostra foi conectada no topo do cartucho e por meio do sistema a vácuo, a amostra foi passada pelo

cartucho. Esta amostra foi coletada para realização dos ensaios de toxicidade. Para este procedimento não houve alteração no pH da amostra. O sistema a vácuo permitiu a passagem da amostra com um gotejamento contínuo e lento, para não provocar a perda de substâncias por carreamento.

Após a passagem de toda a amostra, o cartucho foi lavado com 10 mL de metanol 10%, seguido de 10 mL de metanol 20% e 10 mL de metanol 30%, O eluato dessas lavagens foi descartado. O cartucho foi então eluído com 5 mL de acetona. O eluato originado foi coletado em um becker de vidro e colocado para evaporar. A amostra seca foi redissolvida em de 5 mL de metanol e reconstituída ao volume original com água destilada para análise.

4.7.5. QUELAÇÃO COM EDTA

Um volume de 0,2 mL de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) 0,01 M foi adicionado a alíquotas de 10 mL de efluente em seu pH inicial. Em seguida foram realizados os testes de toxicidade e ensaio YES.

4.8. OZONIZAÇÃO

O ozônio foi usado para o pós-tratamento do efluente secundário. A ozonização foi realizada em um reator de vidro vertical de um litro, acoplado a um segundo reator para quantificação do ozônio residual no LCP/UFV.

Para determinar o fluxo de ozônio, realizou-se um teste com uma solução de iodeto de potássio (KI) constituída por 1,5 L de água destilada, 60 mL de KI 1N e 300 mL de H₂SO₄ 4N. A vazão de ozônio (mgO₃ min⁻¹) foi calculada após titulação da solução de KI com uma solução de tiosulfato de sódio 0,1N, utilizando a fórmula:

$$\text{Vazão (mgO}_3\text{.min}^{-1}\text{)} = \frac{\text{eq} \times \text{N} \times \text{V}}{\text{t} \times 1000} \quad (3.5)$$

onde:

eq - peso equivalente do ozônio (24g/eq);

N - normalidade do tiosulfato de sódio (0,1eq/L);

V - volume gasto na titulação com tiosulfato de sódio (mL);

t - tempo de aplicação de ozônio (min).

A vazão de O₃ no gerador foi regulada para 5 mgO₃ min⁻¹, aproximadamente. Com base neste fluxo, estabelecia-se um tempo de aplicação necessário para se obter a dose de 50 mgO₃ L⁻¹. Esta dose foi definida com base em estudos anteriores utilizando o mesmo efluente (MORAIS, 2006; SILVEIRA, 2009). Depois de estabelecido o fluxo de ozônio, alíquotas de 500 mL do efluente secundário, pré-filtradas em papel de filtro qualitativo, foram acondicionadas a 35°C em banho-maria e submetidas à ozonização no reator de vidro. Todos os tratamentos com ozônio foram realizados em duplicata, à temperatura constante de 35°C e sem ajuste de pH, uma vez que estudos anteriores mostraram que pH e temperatura não apresentaram influência na remoção de DQO e no aumento da DBO₅ e da biodegradabilidade, sugerindo que não é necessária nenhuma manipulação do efluente para correção de temperatura e pH (MORAIS *et al.*, 2008).

Os residuais de ozônio foram absorvidos em um frasco contendo iodeto de potássio e quantificados por titulação com tiosulfato de sódio 0,1 mol L⁻¹ padronizado, obtendo-se então a porcentagem de ozônio que realmente reagiu com os efluentes. Calculava-se o residual de O₃ pela seguinte fórmula:

$$\text{Ozônio residual}(\text{mgL}^{-1}) = \frac{eq \times N \times V}{1000} \text{ (mg O}_3\text{)} \quad (3.6)$$

onde:

eq – peso equivalente de ozônio = 24g/eq;

N - normalidade do tiosulfato de sódio = 0,1eq/L;

V - volume gasto na titulação com tiosulfato de sódio (mL).

A eficiência de todos os tratamentos com ozônio foi avaliada pela quantificação de O₃ residual, pH, DQO, DBO, cor, lignina, carboidratos, toxicidade aguda e crônica, e atividade estrogênica (ensaio YES).

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

Os efluentes utilizados foram submetidos a uma caracterização inicial. Os resultados da caracterização físico-química dos efluentes primário e secundário estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Caracterização físico-química dos efluentes primário e secundário (valores médios \pm desvios padrão, n=5)

Parâmetro	Efluente Primário	Efluente Secundário
pH	7,7 \pm 0,4	8,4 \pm 0,3
DQO (mgO ₂ .L ⁻¹)	956 \pm 199	263 \pm 46
DBO ₅ (mgO ₂ .L ⁻¹)	477 \pm 75,8	45 \pm 21,0
Relação DBO/DQO	0,5 \pm 0,1	0,2 \pm 0,1
COT (mgC L ⁻¹)	231	56
Carboidratos (mg glicose.L ⁻¹)	184 \pm 47,6	37 \pm 6,8
Lignina (mg fenol.L ⁻¹)	57 \pm 11,6	20 \pm 3,5
Cor (mg Pt.L ⁻¹)	1022 \pm 151,2	794 \pm 225,7
AOX (mg Cl.L ⁻¹)	3,0	1,5

O tratamento biológico realizado na indústria foi eficiente na remoção de DBO₅, sendo a remoção média superior a 90%. Este resultado é o esperado visto que o tratamento biológico remove principalmente os compostos biodegradáveis, o que explica também a redução na biodegradabilidade (relação DBO₅/DQO) após o tratamento. Ao analisar a remoção de parâmetros como DQO (72%), COT (75%), lignina (65%) e AOX (50%), observa-se que o efluente ainda pode conter substâncias recalcitrantes ao tratamento biológico, muitas dessas nocivas à vida aquática nos corpos receptores. Observa-se que a remoção de cor foi de apenas 20%, o efluente apresenta uma coloração escura mesmo após o tratamento biológico.

A caracterização físico-química também foi realizada para as frações de alta (AMM) e baixa massa molar (BMM), separadas em membrana com limite de

exclusão molecular de 500 g. mol⁻¹. A caracterização físico-química dessas frações, após serem reconstituídos aos volumes originais, está apresentada na Tabela 2.

Tabela 2 - Caracterização físico-química das frações de alta (AMM) e baixa (BMM) massa molar dos efluentes primário e secundário (valores médios ± desvios padrão, n=5)

Parâmetro	Efluente Primário		Efluente Secundário	
	AMM	BMM	AMM	BMM
DQO (mgO ₂ .L ⁻¹)	406 ± 35	280 ± 23	210 ± 16	30 ± 3
DBO ₅ (mgO ₂ . L ⁻¹)	67 ± 5	219 ± 11	24 ± 2	17 ± 2
COT (mgC L ⁻¹)	162 ± 24	57 ± 13	64 ± 10	28 ± 7
Carboidratos (mg glicose.L ⁻¹)	65 ± 4	92 ± 11	14 ± 3	4 ± 1
Lignina (mg fenol.L ⁻¹)	52 ± 8	11 ± 3	15 ± 3	5 ± 1
Cor (mg Pt.L ⁻¹)	891 ± 28	44 ± 16	386 ± 9	42 ± 9
AOX (mg Cl.L ⁻¹)	2 ± 1,06	1,2 ± 0,4	0,8 ± 0,2	1,5 ± 0,3

A maior concentração dos parâmetros analisados, tanto para o efluente primário quanto para o secundário, estava contida na fração de alta massa molar. A diferença de cor entre as frações de baixa e alta massa é facilmente visualizada (Figura 6). A fração de baixa massa molar apresentou maior contribuição apenas para DBO₅ e carboidratos para o efluente primário.

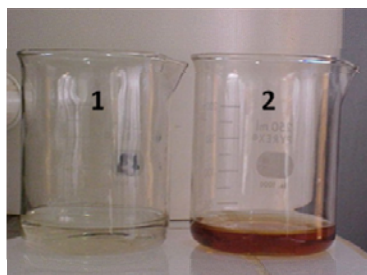


Figura 6 - Visualização dos efluentes após o processo de separação baseada em baixa (1) e alta massa molar (2).

Resultados obtidos por Silveira (2009) demonstram que a fração de alta massa molar apresentou menor biotratabilidade, sendo responsável por boa parte dos compostos recalcitrantes presentes nos efluentes. De acordo com Morais *et al.* (2008), a maior recalcitrância da matéria orgânica de alta massa molar indica que o aumento da eficiência do tratamento biológico pode ser alcançado através da conversão da matéria orgânica de alta massa molar em compostos de baixa massa molar.

5.2. ENSAIOS DE TOXICIDADE

5.3.1. TOXICIDADE AGUDA

Os ensaios de toxicidade aguda foram realizados com o microcrustáceo *Daphnia similis*. Os testes foram realizados com os efluentes primários e secundários para avaliação da toxicidade inicial do efluente e avaliação da toxicidade após o tratamento biológico. Os dados experimentais dos ensaios de toxicidade aguda estão apresentados na Tabela B.1, Anexo B.

Em nenhum dos testes houve uma mortalidade significativa desses organismos, mesmo quando foram utilizadas concentrações iguais a 100% de efluente. Isto significa que os efluentes primários e secundários não apresentaram toxicidade aguda a *Daphnia similis*.

5.3.2. TOXICIDADE CRÔNICA

Os ensaios de toxicidade crônica foram realizados com a alga verde *Pseudokirchneriella subcapitata* e com o microcrustáceo *Ceriodaphnia dubia*. Os ensaios com *Ceriodaphnia dubia* foram feitos apenas com os efluentes das duas últimas coletas. Os dados experimentais dos ensaios de toxicidade crônica estão apresentados nas Tabelas B.2 e B.3, Anexo B.

Os resultados dos ensaios realizados com a alga verde *Pseudokirchneriella subcapitata* estão apresentados na Tabela 3. Os resultados em termos de CI_{25} apontam para uma remoção da toxicidade crônica após o tratamento biológico realizado na indústria, porém apesar do tratamento reduzir a toxicidade, o efluente secundário ainda apresentou efeito crônico. Para o efluente primário,

concentrações acima de 7,5% (valor médio) provocam efeitos deletérios ao crescimento da alga. Essa concentração aumenta para 17,4% (valor médio) quando o efluente secundário é analisado.

Este efeito de remoção também é observado ao avaliar as concentrações testadas através do método Dunnett (CENO, CEO e VC). Em todos os ensaios observa-se que para o efluente primário a menor concentração testada (12,5%) provoca efeitos de inibição ao crescimento da alga. Para o efluente secundário esta concentração aumenta para 20% (valor CEO médio).

Tabela 3 - Efeito crônico dos efluentes primário e secundário obtido através de ensaios com a alga verde *Pseudokirchneriella subcapitata*

Amostras		CI ₂₅ ,%	CENO%	CEO%	VC%
Amostra 1	Primário	7,4	< 12,5	12,5	< 12,5
	Secundário	9,3	< 12,5	12,5	< 12,5
Amostra 2	Primário	6,4	< 12,5	12,5	< 12,5
	Secundário	15,4	< 12,5	12,5	< 12,5
Amostra 3	Primário	5,4	< 12,5	12,5	< 12,5
	Secundário	20,5	12,5	25,0	17,7
Amostra 4	Primário	5,7	< 12,5	12,5	< 12,5
	Secundário	21,8	12,5	25,0	17,7
Amostra 5	Primário	12,9	< 12,5	12,5	< 12,5
	Secundário	20,0	12,5	25,0	17,7
Média	Primário	7,5 ± 3,1	< 12,5	12,5	< 12,5
	Secundário	17,4 ± 5,2	-	20,0 ± 6,8	-

Na Tabela 4 estão os resultados dos ensaios com o microcrustáceo *Ceriodaphnia dubia*, realizados com os efluentes primários e secundários das amostras 4 e 5. Os resultados foram similares aos encontrados para a alga (Tabela 3). Em termos de CI_{25} verificou-se uma remoção da toxicidade após a seqüência de tratamento da indústria, mas o efluente secundário ainda apresentou toxicidade crônica. Através do método Dunnett a remoção da toxicidade não foi observada, mas este resultado provavelmente se deve ao número reduzido de concentrações testadas. Se fosse avaliado um número maior de concentrações, uma diferença entre a toxicidade do efluente primário e secundário poderia ser observada.

Tabela 4 - Efeito crônico dos efluentes primário e secundário obtidos através de ensaios com o microcrustáceo *Ceriodaphnia dubia*

Amostra		CI_{25} , %	CENO, %	CEO, %	VC, %
Amostra 4	Primário	10,4	12,5	25	17,7
	Secundário	15,5	12,5	25	17,7
Amostra 5	Primário	25,8	6,25	12,5	8.8
	Secundário	55,8	6,25	12,5	8.8

Furley *et al.* (2009), avaliaram a toxicidade de efluentes de fábricas de celulose e papel na América Latina através de ensaios com *Ceriodaphnia dubia*. Todas as fábricas de celulose avaliadas operavam branqueamento tipo ECF e o efluente era tratado por sistemas biológicos aerados. A toxicidade do efluente secundário de três fábricas avaliadas no trabalho citado, expressa como CENO, foi de 10, 30 e 5%. Os resultados demonstram que efluentes de fábricas de celulose, mesmo após o tratamento biológico, ainda apresentam toxicidade crônica.

Na Tabela 5 está apresentada a avaliação da toxicidade crônica das frações de AMM e BMM do efluente. Os ensaios foram realizados com a alga *Pseudokirchneriella subcapitata* e os resultados foram expressos em termos de CI_{25} . A toxicidade foi maior para as frações de AMM, na qual havia uma maior

concentração dos parâmetros analisados, entre eles lignina, DQO, COT e AOX (Tabela 2). Para as frações de BMM, nas amostras 1 e 3, a CI_{25} não foi calculada porque o efluente estimulou, e não inibiu o crescimento da alga.

Esses resultados demonstram uma associação da toxicidade com a presença de compostos recalcitrantes, pois a fração recalcitrante dos efluentes de branqueamento é caracterizada por compostos de alta massa molar ($> 1 \text{ kg mol}^{-1}$). Como discutido, efluentes de fábricas de celulose branqueada contêm substâncias recalcitrantes que incluem lignina residual, extrativos e seus subprodutos e a presença dessas substâncias está relacionada com a toxicidade do efluente.

Tabela 5 - Efeito crônico das frações de AMM e BMM expresso como CI_{25} obtidos através de ensaios com a alga verde *Pseudokirchneriella subcapitata*

Amostras	CI_{25} , %					
	Efluente Primário			Efluente Secundário		
	Inicial	AMM	BMM	Inicial	AMM	BMM
Amostra 1	7,4	8,5	27,2	9,3	39,4	NC
Amostra 2	6,4	8,9	31,1	15,4	39,5	45,5
Amostra 3	5,4	5,3	6,2	20,5	45,3	NC
Amostra 4	5,7	16,5	29,1	21,8	47,2	90,6
Amostra 5	12,9	15,7	31,5	20,0	50,3	89,4
Média	$7,5 \pm 3$	$11,0 \pm 5$	$25,0 \pm 11$	$17,4 \pm 5$	$44,3 \pm 5$	-

NC = não calculado pelo programa computacional devido a efeitos de estímulo (e não inibição) ao crescimento da alga.

Para avaliar a toxicidade do efluente, deve-se considerar ainda que no lançamento do efluente no corpo receptor haverá uma diluição, que diminuirá ou até mesmo removerá o efeito tóxico do efluente. A diluição do efluente após o lançamento no corpo receptor (DER, Equação 3.1) é:

$$DER = \frac{0,98 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1} \times 100}{0,98 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1} + 110 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}} = 0,88\%$$

onde:

$0,98 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ = vazão média do efluente avaliado ($84.669 \text{ m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$);

$110 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ = $Q_{7,10}$ do corpo receptor.

Comparando o valor da DER, com os valores da CENO do efluente secundário nos ensaios com *P. subcapitata* ($\leq 12,5\%$, Tabela 4) e *C. dubia* (6,25 a 12,5%, Tabela 5), utilizando a equação 3.2, temos:

$$\frac{CENO}{10} = \frac{12,5}{10} > 0,88 \quad \text{mas} \quad \frac{CENO}{10} = \frac{6,25}{10} < 0,88$$

Esses resultados indicam que o efluente poderia ser classificado como tóxico, após diluição no corpo receptor, nos dias em que a CENO foi $\leq 6,25\%$. Dessa forma, o estudo de identificação da toxicidade é importante para identificar as substâncias que causam a toxicidade no efluente.

5.3.3. ESTUDO DE IDENTIFICAÇÃO DA TOXICIDADE

Após a caracterização inicial, o efluente secundário passou por um estudo de identificação da toxicidade. Foram realizados ensaios de toxicidade crônica com a alga *P. subcapitata* e com o microcrustáceo *C. dubia*. Os dados experimentais de todos os testes, após cada manipulação realizada com o efluente, estão no Anexo B.

Nesta etapa também foi avaliada a toxicidade do efluente secundário após o tratamento com ozônio, o que possibilitou verificar o efeito da ozonização na remoção da toxicidade.

5.3.3.1. ENSAIOS COM A ALGA *Pseudokirchneriella subcapitata*

Os resultados dos ensaios com a alga, em termos da CI_{25} , estão apresentados na Tabela 6. Um resumo dos resultados está no gráfico da Figura 6, elaborado com os valores médios da CI_{25} . Através dos resultados pode-se observar que as maiores remoções de toxicidade crônica ocorreram nos processos de

extração em fase sólida, aeração e ajuste do pH para 3. As outras manipulações realizadas não provocaram efeitos significativos na remoção da toxicidade.

A maior remoção de toxicidade ocorreu quando o efluente passou pelo processo de extração em fase sólida (cartucho C₁₈). Este processo é usado para determinar se a toxicidade se deve a compostos orgânicos e/ou metais complexados apolares. A fração recalcitrante do efluente que inclui lignina residual e extrativos (como β -sitosterol, campesterol e estigmasterol) possui algumas dessas características: são compostos orgânicos apolares. No processo de extração, quando a amostra de efluente foi percolada através do cartucho, essas substâncias ficaram retidas, ou seja, foram concentradas no cartucho. Desta maneira, ao analisar a amostra que foi percolada, nota-se que a toxicidade diminuiu, porém a toxicidade do material retido no cartucho (após ser ressuspensão) foi praticamente a mesma do efluente secundário sem manipulação.

Em relação aos metais complexados, pode-se verificar que esses compostos não alteram a toxicidade do efluente. A quelação com EDTA, processo realizado para determinar se metais catiônicos são responsáveis pela toxicidade, não provocou efeitos de remoção na toxicidade.

A aeração pode levar à oxidação e/ou volatilização de compostos orgânicos, levando a uma redução da toxicidade. Embora o tratamento de efluentes na indústria seja um sistema aerado, a intensificação da aeração pode ser eficiente na remoção da toxicidade.

A modificação de pH pode afetar a solubilidade, polaridade, volatilidade, estabilidade e especiação de substâncias, afetando assim sua biodisponibilidade e toxicidade. Em pH ácido as frações de lignina e extrativos são mais estáveis, ou seja, em meio ácido a reatividade diminuiu. Em meio básico essa reatividade aumenta. Desta maneira, a toxicidade pode estar associada a reatividade dessas substâncias.

O tratamento com ozônio se mostrou eficiente na remoção da toxicidade. A ozonização do efluente secundário resultou em efeito de estímulo e não de inibição ao crescimento da alga.

Tabela 6 - Efeito crônico do efluente secundário, expresso como CI₂₅, obtido através de ensaios com a alga verde *P. subcapitata* após manipulações para identificação da toxicidade

Manipulação	CI ₂₅ %			
	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5	Média
Toxicidade inicial ¹	20,5	21,8	20,0	20,8 ± 1
Ajuste pH (pH = 3)	58,3	44,0	20,2	40,9 ± 19
Ajuste pH (pH = 11)	22,1	15,8	13,4	17,1 ± 4
Aeração	40,1	39,7	52,1	44,0 ± 7
Filtração membrana AP 40	28,2	28,1	30,3	28,9 ± 1
Material retido no cartucho ²	87,7	87,2	86,6	87,2 ± 1
Material não retido no cartucho ³	20,3	22,2	12,1	18,2 ± 5
Quelação com EDTA	19,9	25,8	22,4	22,7 ± 3
Ozonização	NC	NC	NC	-

¹ Representa a toxicidade do efluente secundário (sem manipulação).

² Efluente que passou pelo cartucho C₁₈ no processo de extração em fase sólida.

³ Analito que ficou concentrado no cartucho C₁₈ e depois foi eluído em metanol para ser analisado.

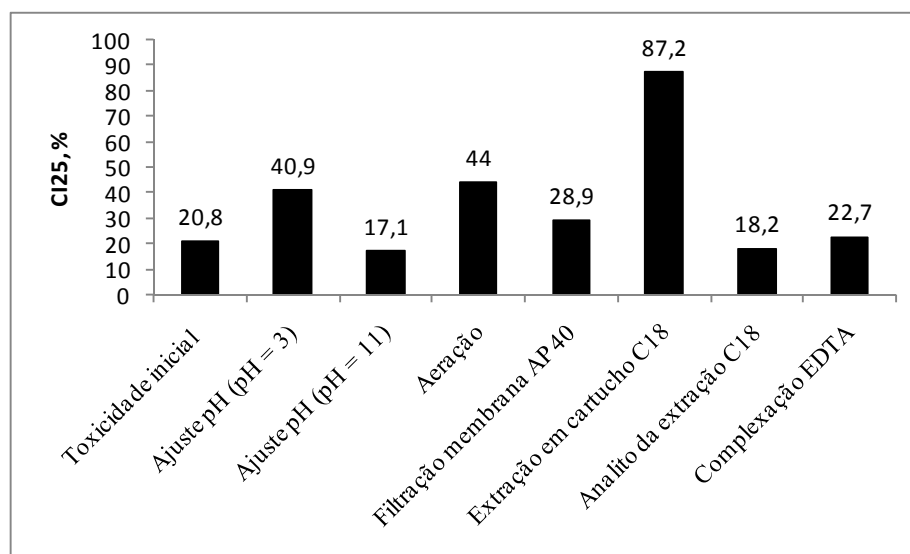


Figura 7 - Toxicidade crônica do efluente secundário à alga *P. subcapitata*, após diferentes manipulações físico-químicas.

5.3.3.2. ENSAIOS COM O MICROCRUSTÁCEO *Ceriodaphnia dubia*

Os resultados dos ensaios do estudo TIE com *C. dubia* estão apresentados na Tabelas 7. A CI_{25} média após as diversas manipulações, considerando os ensaios das duas amostras, está apresentada no gráfico da Figura 7.

Assim como nos ensaios realizados com a alga (Tabela 6), é possível observar que as manipulações que levaram a uma maior remoção de toxicidade também foram a extração em fase sólida, aeração e ajuste do pH para 3. Como discutido, estes resultados demonstram uma associação da toxicidade com a presença de compostos recalcitrantes no efluente.

Observa-se ainda que a ozonização foi eficiente na remoção da toxicidade do efluente secundário. Neste caso, embora o tratamento com ozônio não tenha levado a um estímulo ao crescimento do microcrustáceo (como no caso da alga), a CI_{25} encontrada após a ozonização foi mais elevada quando comparada à CI_{25} do efluente secundário antes do tratamento com ozônio.

Tabela 7 - Efeito crônico do efluente secundário, expresso como CI_{25} , obtido através de ensaios com o microcrustácio *C. dubia* após manipulações para identificação da toxicidade

Manipulação	CI_{25} (%)		
	Amostra 4	Amostra 5	Média
Toxicidade inicial	15,5	55,8	35,6 ± 32
Ajuste pH (pH = 3)	55,6	42,4	49,0 ± 10
Ajuste pH (pH = 11)	21,6	28,31	25,0 ± 5
Aeração	31,8	25,0	28,4 ± 5
Filtração (membrana AP 40)	17,2	33,6	25,4 ± 11
Material retido no cartucho	78,3	49,9	64,1 ± 20
Material não retido no cartucho	12,5	33,7	23,1 ± 15
Quelação com EDTA	12,5	21,8	17,1 ± 6
Ozonização	90,1	88,8	89,5 ± 1

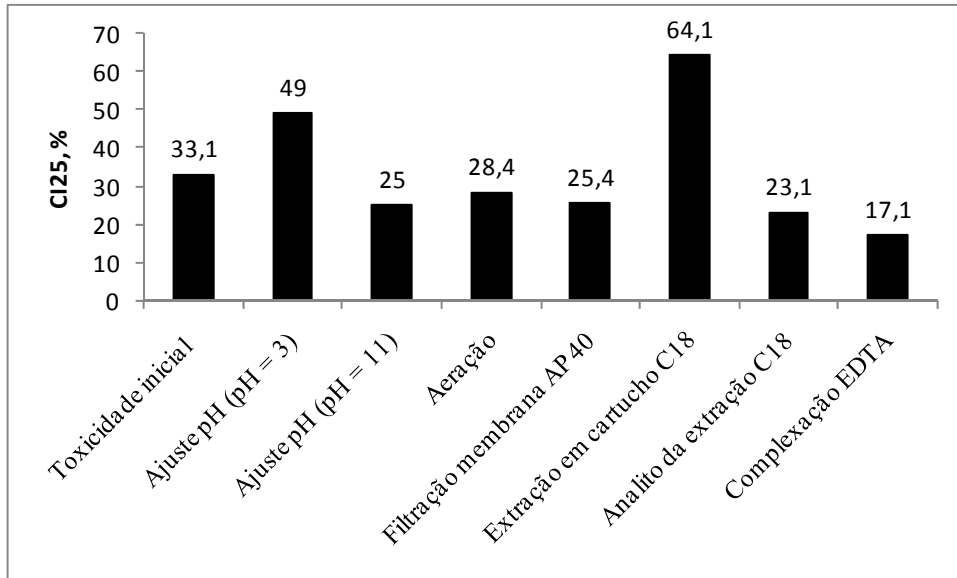


Figura 8 - Toxicidade crônica do efluente secundário ao microcrustáceo *C. dubia*, após diferentes manipulações físico-químicas.

5.4. ENSAIO YES

A Figura 8 apresenta uma curva dose-resposta de 17β -estradiol obtida neste estudo, necessária para determinação da concentração equivalente de estradiol (EQ-E2) de cada amostra. Observa-se que a curva obtida está de acordo com a literatura (ROUTLEDE e SUMPTER, 1996; BILA, 2005; FERREIRA, 2008), validando os testes aqui realizados.

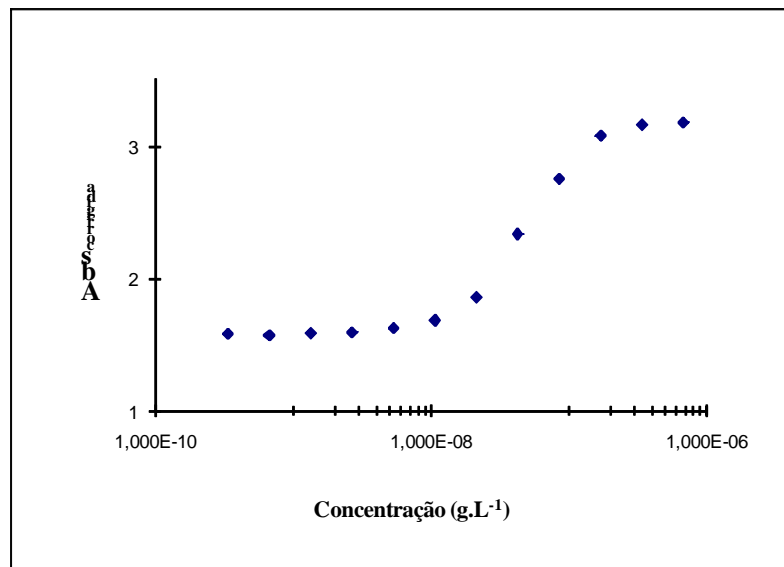


Figura 9 - Curva dose-resposta de 17β -estradiol no ensaio YES.

O efluente apresentou atividade estrogênica mediante o ensaio YES, como mostrado na Tabela 8, onde estão apresentados os valores da concentração equivalente de estradiol para os efluentes primário e secundário.

Tabela 8 - Resultado do ensaio YES expresso como EQ-E2 para os efluentes primário e secundário (valor médio \pm desvio padrão, n = 4)

Amostras		EQ-E2 ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
Amostra 3	Primário	11,6 \pm 4
	Secundário	7,7 \pm 1
Amostra 4	Primário	8,2 \pm 2
	Secundário	6,1 \pm 1
Amostra 5	Primário	11,2 \pm 1
	Secundário	9,1 \pm 2

Existem poucos trabalhos que apresentam a atividade estrogênica de efluentes industriais em termos de EQ-E2, porém embora as concentrações encontradas sejam baixas, estudos realizados por Fent (2006) e Johnson *et al.* (2000) indicam que concentrações de 17 β -estradiol na ordem de ng.L^{-1} já podem provocar danos à comunidade aquática, como alterações no sistema reprodutivo de peixes.

Pesquisas realizadas com efluentes de indústrias farmacêuticas (STUMPF *et al.*, 1999) identificaram que a concentração de esteróis no efluente esteve na ordem de mg.L^{-1} . Após a diluição no corpo receptor foram detectadas concentrações na faixa de $\mu\text{g.L}^{-1}$. Estes resultados são equivalentes para indústrias petroquímicas. Kostamo e Kukkonen (2003) verificaram que a concentração de esteróis em efluentes de fábricas de celulose variam numa faixa de 71 a 535 mg.L^{-1} , sendo o β -sitosterol a substância presente em maior concentração. Existem também as pesquisas realizadas em ETEs, com objetivo de identificar a presença dos principais estrogênios naturais. No Brasil em 1997, TERNES *et al.* (1999a) realizaram o monitoramento de estrogênios naturais e do contraceptivo sintético na ETE da Penha/RJ. No esgoto doméstico, os estrogênios 17 β -estradiol e estrona

foram detectados em concentrações de 0,021 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 0,04 $\mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente.

Como existem uma série de compostos que podem causar atividade estrogênica, as manipulações realizadas no estudo TIE também foram aplicadas para realização do ensaio YES. Os resultados estão apresentados na Tabela 9. As manipulações não interferiram na atividade estrogênica do efluente, pois a concentração EQ-E2 não variou para os diferentes ensaios realizados. Somente a extração em fase sólida se mostrou eficiente na remoção da atividade estrogênica, neste caso a concentração equivalente se reduziu para a ordem de ng.L^{-1} .

Tabela 9 - Resultado do ensaio YES expresso como EQ-E2 para o efluente secundário após manipulações

Manipulação	EQ-E2 ($\mu\text{g.L}^{-1}$)			
	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5	Média
Atividade estrogênica inicial	7,7	6,1	9,1	7,6 \pm 1,5
Ajuste pH (pH = 3)	7,4	7,0	8,7	7,7 \pm 0,9
Ajuste pH (pH = 11)	7,6	6,6	8,9	7,7 \pm 1,5
Aeração	6,1	5,9	8,9	7,0 \pm 1,5
Filtração em membrana Ap 40	7,1	5,9	8,7	7,3 \pm 4,5
Material retido no cartucho	<LD	5,9.10 ⁻³	5,0. 10 ⁻³	5,5. 10 ⁻³ \pm 0,6
Material não retido no cartucho	6,02	6,23	7,93	6,73 \pm 1,2
Ozonização	<LD	<LD	5,14. 10 ⁻³	-

<LD = abaixo do limite de detecção do ensaio.

O tratamento com ozônio foi eficiente na remoção da estrogenicidade do efluente. Após a ozonização não foi identificada atividade estrogênica para o efluente das Amostras 3 e 4, somente o efluente da Amostra 5 apresentou atividade após o tratamento. Na ozonização, o O₃ molecular reage principalmente com certos grupamentos, dentre eles o fenólico, que é um grupo doador de elétrons e pelo qual ataque pelo ozônio ocorre. Isto pode ser bastante interessante no caso dos esteróides já que seu anel fenólico é o que confere atividade estrogênica a esses desreguladores endócrinos (BIRKETT e LESTER, 2003).

5.5. TRATAMENTO COM OZÔNIO

A caracterização físico-química do efluente, após o pós- tratamento com ozônio ($50 \text{ mgO}_3 \text{ L}^{-1}$) está apresentada na Tabela 10. Nessa dose, o residual de ozônio foi inferior a $1,2 \text{ mgO}_3.\text{L}^{-1}$, ou seja, o consumo de O_3 foi maior que 97%. Os dados experimentais das análises feitas em cada tratamento estão apresentados no Anexo C.

A ozonização mostrou-se eficiente na remoção da cor e lignina. A remoção de lignina foi superior a 75% em todos os tratamentos realizados e a remoção média de cor foi de 53%. Resultados obtidos por Silveira (2009) demonstram que a aplicação de uma dose de $500 \text{ mgO}_3 \text{ L}^{-1}$ promove uma remoção de 86% para a cor e 96% para lignina. A remoção de DQO foi de 32% e de COT, 20%. Não houve remoção de carboidratos e DBO. Após o tratamento houve um pequeno aumento na biodegradabilidade do efluente, expressa pela relação DBO_5/DQO .

Tabela 10 – Efeito da ozonização ($50 \text{ mgO}_3 \text{ L}^{-1}$) sobre as características físico-químicas do efluente secundário (valor médio \pm desvio padrão, $n = 5$)

Parâmetro	Efluente secundário	Efluente secundário após ozonização	Remoção (%)
pH	$8,4 \pm 0,5$	$8,6 \pm 0,1$	-
DQO ($\text{mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1}$)	263 ± 46	178 ± 18	32,0
DBO_5 ($\text{mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1}$)	45 ± 21	47 ± 20	NC
Relação DBO/DQO	$0,2 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,5$	NC
COT (mgC L^{-1})	56	45	20,0
Carboidratos ($\text{mg glicose}.\text{L}^{-1}$)	37 ± 7	34 ± 8	NC
Lignina ($\text{mg fenol}.\text{L}^{-1}$)	$20 \pm 3,5$	$5,0 \pm 1$	75,0
Cor ($\text{mg Pt}.\text{L}^{-1}$)	794 ± 226	372 ± 108	53,0

NC = não calculado porque não houve remoção ou a remoção foi insignificante.

Como visto nos itens anteriores, a ozonização foi um processo eficiente na remoção da atividade biológica, pois após o tratamento observou-se uma remoção da toxicidade e da atividade estrogênica do efluente secundário na maioria dos testes realizados. Esta eficiência de remoção se deve principalmente à reação do ozônio com os grupamentos fenólicos, presentes na estrutura das substâncias recalcitrantes do efluente.

6 - CONCLUSÕES

A avaliação da atividade biológica feita por meio desta pesquisa permitiu a elaboração de um diagnóstico de toxicidade e atividade estrogênica do efluente da indústria de celulose kraft branqueada de eucalipto estudada. As principais conclusões são:

- O efluente estudado não apresentou efeito tóxico agudo mediante ensaios realizados com o microcrustáceo *Daphnia similis*.
- O efluente apresentou efeito tóxico crônico através dos ensaios realizados com a alga verde *Pseudokirchneriella subcapitata* e com o microcrustáceo *Ceriodaphnia dubia*. Os resultados apontam para uma remoção da toxicidade crônica após o tratamento biológico realizado na fábrica, porém apesar do tratamento reduzir a toxicidade, o efluente secundário ainda apresentou efeito crônico. Em alguns dias, o efluente seria classificado como tóxico, mesmo após sua diluição no corpo receptor.
- A toxicidade foi mais elevada para as frações de alta massa molar (AMM), nas quais se concentra a fração recalcitrante do efluente.
- A extração em fase sólida, aeração e ajuste do pH para 3, forneceram os melhores resultados (maior remoção da toxicidade) no estudo de identificação da toxicidade, indicando que a toxicidade é causada pela fração recalcitrante do efluente, que inclui lignina residual, extrativos e seus subprodutos.
- O efluente apresentou atividade estrogênica, quantificada pelo ensaio YES. Não houve uma remoção da estrogenicidade do efluente após o tratamento biológico realizada na fábrica.
- A ozonização foi eficiente na remoção da atividade biológica, pois após o tratamento houve uma redução da toxicidade e da atividade estrogênica do efluente secundário, na maioria dos testes realizados.

O estudo realizado possibilitou uma caracterização geral da atividade biológica do efluente. Ressalta-se a importância da continuidade dessa pesquisa no sentido de identificar as principais substâncias que causam a toxicidade e atividade estrogênica do efluente através de estudos em cada setor de produção. Desta forma, poderão ser adotadas medidas para reduzir a atividade biológica.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 12713:2006
Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade Aguda – Método de Ensaio com
Daphnia spp (Cladocera, Crustácea). Rio de Janeiro: ABNT, 2006.
- ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 13373:2006.
Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica – Método de ensaio com
Ceriodaphnia spp (Crustacea, Cladocera). Rio de Janeiro: ABNT, 2006.
- ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 12648:2005.
Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica – Método de ensaio com algas
(Chlorophyceae). Rio de Janeiro: ABNT, 2005.
- ALI, M.; SREEKRISHNAN, T. R. Aquatic toxicity from pulp and paper mill
effluents: a review. *Advances in Environmental Research*. v.5. p. 175-196.
2001.
- ALMEIDA, E., ASSALIN, M. R., ROSA, M. A., DURAN, N. Tratamento de
efluentes industriais por processos oxidativos na presença de ozônio, *Química
Nova*, v. 27, n. 5, pp. 818-824, 2004.
- APHA – AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION – Standard Methods
for the Examination of Water and Wastewater. Washington: APHA, AWWA,
WEF. 20.ed., 1998.
- ARCHIBALD, F.; ROY-ARCAND, L. Photodegradation of high molecular
weight kraft bleachery effluent organochlorine and color. *Water Research*,
Londres, v. 29, n. 2, p. 661-669, 1995.
- AURIOL, M.; FILALI-MEKNASSI, Y.; TYAGI, R. D. Endocrine disrupting
compounds removal from wastewater, a new challenge. *Process Biochemistry*,
v. 41, p. 525-539, 2006.
- BARRICHELO, L.E.G. & BRITTO, J.O. - *Química da Madeira* - Manual
Didático - Centro Acadêmico “Luiz de Queiróz”. USP - Piracicaba. 1989.
- BAIG, S., LIECHTI, P. A., “Ozone treatment for biorefractory COD removal,
Water Science and Technology, v. 43, n.2, p. 197-204, 2001.
- BAKER, V. A. Endocrine disrupters - testing strategies to assess human hazard.
Toxicology in Vitro, v. 15, p. 413–419, 2001.

- BAUMAN, H. D. Ozonation of a kraft mill effluent. *Tappi Journal*, v.57, n.5, p.116-119, 1974.
- BEHNISCH, P. A., FUJII, K., SHIOZAKI, K. Estrogenic and dioxin-like potency in each step of a controlled landfill leachate treatment plant in Japan. *Chemosphere*, v. 43, pp. 977-984, 2001.
- BERESFORD, N., ROUTLEDGE, E. J., HARRIS, C. A. Issues arising when interpreting results from an *in vitro* assay for estrogenic activity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 162, p. 22–33, 2000.
- BIJAN, L.; MOHSENI, M. Using ozone to reduce recalcitrant compounds and to enhance biodegradability of pulp and paper effluents. *Water Science and Technology*, Londres, v. 50, n. 3, p. 173-182, 2004.
- BILA, D. M., *Degradação e remoção da atividade estrogênica do desregulador endócrino 17 β -estradiol pelo processo de ozonização*. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro (COPPE), 2005.
- BILA, D. M., DEZOTTI, M. Fármacos no meio ambiente. *Química Nova*, v. 26, n.4, p. 523-530, 2003.
- BILA, D. M., MONTALVÃO, A. F., AZEVEDO, D. A., DEZOTTI, M. Estrogenic activity removal of 17 β -estradiol by ozonation and identification of by-products. *Chemosphere*, v. 69, p. 736-746, 2007.
- BIRKETT, J. W., LESTER, J. N. *Endocrine disrupters in wastewater and sludge treatment process*. 1 ed. Boca Raton: Lewis Publishers, 2003.
- BLUNDI, C.E.; GADÊLHA, R.F. Metodologia para determinação de matéria orgânica específica em águas residuárias. In: Chernicharo, C.A.L. (coord.) Pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios. (Projeto PROSAB). Belo Horizonte: [s.n.], 2001. cap. 2, p. 9-18.
- BRACELPA – Associação Brasileira de Celulose e Papel. www.bracelpa.org.br. Acesso em março de 2009.
- CASTRO, C. M. B. Perturbadores endócrinos ambientais: uma questão a ser discutida. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 7, n. 1,2, p. 4-5, 2002.
- COLEMAN, H. M., ABDULLAH, M. I., EGGINS, B. R., PALMER, F. L. Photocatalytic degradation of 17 β -oestradiol, oestriol and 17 α -

- ethinyloestradiol in water monitored using fluorescence spectroscopy. *Applied Catalysis B: Environmental*, v. 55, p. 23-30, 2005.
- COLODETTE J. L. *Apostila de Química e Tecnologia do Branqueamento de Celulose*. Departamento de Engenharia Florestal – Laboratório de Celulose e Papel. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2008.
- COLODETTE, J. L., GOMIDE, J. L., OLIVEIRA, R. C. Utilização de peróxido de hidrogênio no branqueamento da polpa kraft de eucalipto. In: Congresso Anual Celulose e Papel, 14. 1981. São Paulo. *Anais...*, São Paulo: ABTCP.
- DASTON, G. P., GOOCH, J. W., BRESLIN, W. J. 1997 “Environmental Estrogens and Reproductive Health: A Discussion of the Human and Environmental Data” *Reproductive Toxicology Review*, v. 11 (4), pp. 465-481.
- DENCE, C.; REEVE, D. *Introduction to the principles and practice of pulp bleaching*. In: DENCE, C.; REEVE, D. (Ed.) *Pulp bleaching – principles and practice*. Atlanta: Tappi Press, 1996. p. 1-24.
- ESPERANZA, M., SUIDAN, M. T., MARFIL-VEJA, R., GONZALEZ, C., SORIAL, G. A., MCCAULEY, P., BRENNER, R. Fate of sex hormones in two pilot-scale municipal wastewater treatment plants: conventional treatment. *Chemosphere*, v. 66, p. 1535–1544, 2007.
- FALCONER, R.; CHAPMAN, H.F.; MOORE, M.R.; RANMUTHUGALA, G. Endocrine-disrupting compounds: A review of their challenge to sustainable and safe water supply and water reuse. *Environmental Toxicology*, v. 21, n. 2, p. 181-191, 2006.
- FENT, K., ESCHER, C., CAMINADA, D. Estrogenic activity of pharmaceuticals and pharmaceutical mixtures in a yeast reporter gene system, *Reproductive Toxicology*, v. 22, p. 175–185, 2006.
- FERREIRA, M. G. M, *Remoção da atividade estrogênica de 17 β -estradiol e de 17 α -etinilestradiol pelos processos de ozonização e O_3/H_2O_2* . Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro (COPPE), 2008.
- FRACÁCIO, R. *Estudos limnológicos e ecotoxicológicos (laboratoriais e in situ), com ênfase na avaliação de toxicidade de metais e de pesticidas organoclorados em peixes (Danio rerio e Poecilia reticulata) – Sub-bacia do*

- rio Monjolinho*. 2006. 209p. Tese de Doutorado Universidade Federal de São Carlos (Ciências Biológicas), 2006.
- FREIRE, R. S.; PELEGRINI, R.; KUBOTA, L. T.; DURAN, N.; ZAMORA, P. P. Novas tendências para o tratamento de resíduos industriais contendo espécies organocloradas. *Química Nova*, São Paulo, v. 23, n. 4, p. 504-511, 2000.
- FURLEY, T. H. Monitoramento do efluente da Aracruz Celulose S.A. através do uso de mexilhões como indicadores de metais pesados e organoclorados. In: Congresso Anual de Celulose e Papel, 42. 2009. São Paulo. *Anais...*, São Paulo: ABTCP. p. 387 – 398.
- FURLEY, T. H. Identificação da causa da toxicidade de efluentes de fábricas de celulose e papel a América Latina. *O Papel*, v.25, p.34-42, 2009.
- GARG, S.K.; MODI, D.R. Decolorization of pulp-paper mill effluents by white-rot fungi. *Critical Reviews in Biotechnology*, v.19, p.85-112. 1999.
- GILMAN, C.I.; LEUSCH, F.D.L.; BRECKENRIDGE, W.C.; MacLATCHY, D.L. Effects of a phytosterol mixture on male fish plasma lipoprotein fractions and testis P450 activity. *General and Comparative Endocrinology*. v.130, p.172–184, 2003.
- GOMES, C. M.; COLODETTE, J.L.; MOUNTEER, A.H.; DELANTONIO, N. R. N.; SILVA, C.M.. Characterization and biodegradability of effluents derived from hot acid hydrolysis and hot chlorine dioxide bleaching of eucalyptus pulp. *Appita Journal.*, v. 60, p.65-69, 2007.
- GRAY JR, L. E. Xenoendocrine disrupters: Laboratory studies on male reproductive effects. *Toxicology Letters*, v. 102-103, p. 331-335, 1998.
- HALL, E.R.; RANDLE, W.G. AOX removal from bleached kraft mill wastewater: a comparison of three biological treatment processes. *Water Science and Technology*, v.26, n.1-2, p.387-396. 1992.
- HAMBLIN, E. L., CRONIN, M. T. D., SCHULTZ, T. W. Estrogenicity and acute toxicity of selected anilines using a recombinant yeast assay. *Chemosphere*, v. 52, p. 1173–1181, 2003.
- HEWITT, L.M.; MARVIN, C.H. Analytical methods in environmental effects-directed investigations of effluents. *Mutation Research*. n.589. p.208–232, 2005

- HEWITT, L.M.; PARROTT JL, McMASTER ME. A decade of research on the environmental impacts of pulp and paper mill effluents in Canada: sources and characteristics of bioactive substances. *Journal of Toxicology and Environmental Health B Critical Reviews*. v. 9, n. 4, p. 341-56, 2006.
- HOSTACHY, J.C.; LENON, G.; PISICCHIO, J.L.; COSTE, C.; LEGAY, C. Reduction of pulp and paper mill pollution by ozone treatment. *Water Science and Technology*, vol.35, n.2-3, p.261–268, 1997.
- JOBLING, S., NOLAN, M., TYLER, C.R. Widespread sexual disruption in wild fish. *Environmental Science Technology*, v. 32, p. 2498-2506, 1998.
- JOHNSON, A.C., SUMPTER, J.P. Removal of endocrine-disrupting chemicals in activated sludge treatment works. *Environmental Science and Technology*, v. 35, n. 24, p. 4697-4703, 2001.
- JOHNSON, A. C., BELFROID, A., DI CORCIA, A. Estimating Steroid oestrogen inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent. *Science of the Total Environment*, v. 256, pp.163-173, 2000.
- KONDURU, R.R.; LISS, S.N.; ALLEN, D.G. Recalcitrant organics emerging from biological treatment of kraft mill effluents. *Water Quality Research Journal of Canada*, Ottawa, v. 36, n. 4, p. 737-757, 2001.
- KOSTAMO, A.; HOLMBOM, B.; KUKKONEN, J.V.K. Fate of wood extractives in wastewater treatment plants at kraft pulp mills and mechanical pulp mills. *Water Research*. v.38. p.972–982, 2004.
- KREETACHAT, T.; DAMRONGSRI, M.; PUNSUWON, V.; VAITHANOMSAT, P.; CHIEMCHAI SRI, C.; CHOMSURIN, C. Effects of ozonation process on lignin-derived compounds in pulp and paper mill effluents. *Journal of Hazardous Materials*, v.142, p.250-257, 2007.
- KUNZ, A.; FREIRE, R. S.; ROHWEDDER, J. J. R.; DURÁN, N.; MANSILLA, H.; RODRIGUEZ, J. Construção e otimização de um sistema para produção e aplicação de ozônio em escala de laboratório. *Química Nova*, v.22, n.3, p.425-428, 1999.

- LEGLER, J., DENNEKAMP, M., VETHAAK, A. D. Detection of estrogenic activity in sediment-associated compounds using in vitro reporter gene assays. *Science of the Total Environmental*, v. 293, p. 69-83, 2002.
- MANSILLA, H.D.; YEBER, M.C.; FREER, J.; RODRÍGUEZ, J.; BAEZA, J. Homogeneous and heterogeneous advanced oxidation of a bleaching effluent from the pulp and paper industry. *Water Science and Technology*, v.35, n.4, p.273–278, 1997.
- MELNYK, P. B.; JUDKINS, D.; NETZER, A. An ozone reactor for color removal from pulp bleaching wastes. *Tappi Journal*, v. 60, n.3, p.97-100, 1977.
- METCALF e EDDY. *Wastewater engineering: treatment and reuse*. 4 ed. Boston: McGraw-Hill, 2003.
- MORAIS, A.A.; MOUNTEER, A.H.; SILVEIRA, D.S.A. Improvement of bleached eucalypt kraft pulp effluent treatment through combined ozone-biological treatment. *Tappi Journal*, v. 7, n. 2, p. 15-21, 2008.
- MORAIS, A. A. Uso de ozônio como pré e pós-tratamento de efluentes da indústria de celulose kraft branqueada. 2006. 109 p. Dissertação de mestrado. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa (Departamento de Engenharia Civil), 2007.
- MOUNTEER, A.H.; MOKFIENSKI, J.J. Remoção de material orgânico recalcitrante em efluentes de celulose kraft branqueada por ozonização. *O Papel*, v.66, n.3, p.64-70, 2005.
- MOUNTEER, A.H.; PEREIRA, R.O. MORAIS, A.A., RUAS, D.B.; SILVEIRA, D.S.A.; VIANA, D.B.; MEDEIROS, R.C. Advanced oxidation of bleached eucalypt kraft pulp mill effluent. *Water Science and Technology*, v. 55, n. 6, p. 109-116, 2007.
- NAVARRO, R. M. S. (2004). Estudo dos diferentes tipos de processos de branqueamento de celulose objetivando a comparação entre seus métodos e a geração do potencial de poluentes em seus respectivos efluentes. Dissertação de mestrado. Campinas: Unicamp (Engenharia Química), 2004.
- NIEMINEN, P.; MUSTONEN, A.M.; LINDSTRÖM-SEPPÄ, P.; ASIKAINEN, J.; MUSSALO-RAUHAMAA, H.; KUKKONEN, J.V.K. Phytosterols act as

- endocrine and metabolic disruptors in the European polecat (*Mustela putorius*). *Toxicology and Applied Pharmacology*, n.178, p.22–28, 2002.
- NOGUEIRA, J. M. F. Desreguladores endócrinos: efeitos adversos e estratégias para monitoração dos sistemas aquáticos. *Química Nova*, v. 88, p. 65-71, 2003.
- OLSSON, P.E.; BORG, B.; BRUNSTRÖM, B.; HÅKANSSON, H.; KLASSON-WEHLER, E. Endocrine disrupting substances - Impairment of reproduction and development. Estocolmo: Swedish Environmental Protection Agency. 1998.
- ORN, S.; SVENSON, A.; VIKTOR, T.; HOLBECH, H.; NORRGREN, L. Male-biased sex ratios and vitellogenin induction in zebrafish exposed to effluent water from a Swedish pulp mill. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 51, p. 445–451, 2006.
- PERALTA-ZAMORA, P.; ESPÓSITO, E.; REYES, J.; DURÁN, N. R. Remediação de efluentes derivados da indústria de papel e celulose. tratamento biológico e fotocatalítico. *Química Nova*, v.20, n.2, p.186-190, 1997.
- POKHREL, D.; VIRARAGHAVAN, T. Treatment of pulp and paper mill wastewater—a review. *Science of the Total Environment*, Amsterdã, v. 333, p. 37– 58, 2004.
- PIRES, E.C.; BUZZINI, A.P. Avaliação do desempenho de um reator anaeróbio de manta de lodo (UASB) no tratamento de licor negro diluído proveniente de uma indústria de polpa kraft. In: Congresso Anual de Celulose e Papel, 32. 1999. São Paulo. *Anais...*, São Paulo. 1 CD-ROM.
- ROUTLEDGE, E. J., SUMPTER, J. P. Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 15, n. 3, pp. 241-248, 1996.
- SANTAMARTA, J. A ameaça dos disruptores endócrinos. *Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável*. Porto Alegre, v.2, n.3, jul./set.2001.
- SERVOS, M. R., BENNIE, D. T., BURNISON, B. K., JURKOVICB, A., MCINNISB, R., NEHELIB, T., SCHNELLC, A., SETOB, P., SMYTHB, S. A., TERNESD, T. A. Distribution of estrogens, 17 β -estradiol and estrone, in

- canadian municipal wastewater treatment plants. *Science of the Total Environment*, Amsterdã, v. 336, pp. 155-170, 2005.
- SILVA, F.T.; MATTOS, L.R.; PAIVA, T.C.B. Treatment of an ECF effluent by combined use of activated sludge and advanced oxidation process. *Water Science and Technology*, v. 55, n. 6. p. 151–156, 2007.
- SILVEIRA, D. S. A . Avaliação da eficiência da ozonização combinada com o tratamento por lodos ativados de efluentes de celulose kraft branqueada. Dissertação de mestrado. Viçosa:Universidade Federal de Viçosa (Departamento de Engenharia Civil), 2009.
- SMOOK D. A. *Handbook for pulp and paper technologists*. 2 ed. Vancouver: Angus Wilde Publications, 1992.
- SONNENBERG, L.B., WIMER, P., ARD, T.A. Transformations of wastewater during biological treatment. In: *International Environmental Conference*, 1995. Atlanta. *Proceedings...*, Atlanta: Tappi Press. p.219–231.
- SOUZA L. C. *Tratabilidade de efluentes provenientes de duas seqüências ECF de branqueamento de celulose kraft de eucalipto*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa (Agroquímica), 2001.
- STUMPF, M., TERNES, T. A., WILKEN, R. Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Science of the Total Environment*, v. 225, p. 135-141, 1999.
- TERNES, T. A. Occurrence of drugs in german sewage treatment plants and rivers. *Water Research*, Londres, v. 32, n. 11, p. 3245-3260, 1998.
- TERNES, T. A., STUMPF, M., MUELLER, J. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants – I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. *Science of the Total Environment*, Amsterdã, v. 225, n.1-2, p. 81- 90, 1999.
- TERNES, T. A. Analytical Methods for the determination of pharmaceuticals in aqueous environmental samples. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 20, p. 419-434, 2001.
- TERNES, T. A., STÜBERA, J., HERRMANNA, N. Ozonation: a tool for removal of pharmaceuticals, contrast media and musk fragrances from wastewater? *Water Research*, v. 37, p. 1976–1982, 2003.

- THOMPSON, G.; SWAIN, J.; KAY, M.; FORSTER, C.F. The treatment of pulp and paper mill effluent: A review. *Bioresource Technology*. v.77. p.275–286, 2001.
- TREMBLAY, L.; VAN DER KRAAK, G. Use of a series of homologous *in vitro* and *in vivo* assays to evaluate the endocrine modulating actions of b-sitosterol in rainbow trout. *Aquatic Toxicology*. v.43, p.149–162, 1998.
- USEPA - United States Environmental Protection Agency. *Methods for aquatic toxicity identification evaluations. Phase I toxicity characterization procedures*. Washington: EPA-600/6-91/003, 1991.
- USEPA - United States Environmental Protection Agency. *Toxicity identification evaluation. Characterization of chronically toxic effluents. Phase I*. Washington: EPA-600/6-91/005F, 1992.
- USEPA – United States Environmental Protection Agency. *Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms*. 5 ed. Washington, DC: Office of Water (4303T). 2002a.
- VON GUNTEN, U. Ozonation of drinking water: Part I. Oxidation kinetics and product formation”, *Water Research*, v. 37, pp. 1443-1467, 2003.
- VON SPERLING, M. *Princípios do tratamento biológico de águas residuárias. Vol. 4 - Lodos Ativados*. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Minas Gerais (DESA/UFMG), 2002.
- XAVIER, C.R.; BECERRA, J.; HERNÁNDEZ, V.; CHAMORRO, S.; VIDAL, G. Effects of phytosterols contained in pulp mill effluent on *D. magna* and *D. obtuse*. In: International Conference on Fate and Effects of Pulp and Paper Mill Effluents, 6. 2006, Vitória. *Anais...*, Vitória. CD-ROM.
- ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. *Ecotoxicologia aquática – Princípios e aplicações*. São Carlos: RiMa, 2006.
- ZHOU, H.; SMITH, D.W. Process parameter development for ozonation of kraft pulp mill effluents. *Water Science and Technology*, v.35, n.2–3, p.251-259, 1997.

ANEXOS

DADOS EXPERIMENTAIS E RESULTADOS PRELIMINARES

ANEXO A – ENSAIO YES: CULTIVO DA LEVEDURA E PREPARO DE SOLUÇÕES

CULTIVO DA CEPA DE LEVEDURA

O cultivo foi realizado inoculando-se 100µL da solução estoque da levedura com 10 mL de meio de cultivo. O meio foi incubado a 28°C por aproximadamente 24 h a 100 rpm em um agitador orbital (Modelo No G 24, New Brunswick Scientific).

O meio de cultivo foi preparado pela adição de 5 mL de solução de glicose, 1,25 mL de solução de ácido L-aspartico, 0,5 mL de solução de vitamina, 0,4 mL de solução de L-treonina, e 125µL de solução de sulfato de cobre (II) em 45 mL de meio mínimo.

Solução de glicose

Uma solução de 20% p/v de glicose foi esterilizada em alíquotas de 20 mL a 121°C por 10 min e estocada em temperatura ambiente.

Solução de ácido aspártico

Uma solução estoque de 4 mg.mL⁻¹ de ácido aspártico foi esterilizada em alíquotas de 20 mL a 121°C por 10 min e estocada a temperatura ambiente.

Solução de Vitamina

A solução de vitamina foi preparada pela adição de 8 mg de tiamina, 8 mg de piridoxina, 8 mg de pantetonato de cálcio, 40 mg de inositol e 20 mL de solução de biotina (2mg/100 mL H₂O) em 180 mL de água. Essa solução foi filtrada e esterilizada em membrana de 0,2 µm estéril, e estocada em alíquotas de 10 mL a 4°C em frascos de vidro esterilizados.

Solução de L-treonina

Foi preparada uma solução estoque de 24 mg.mL⁻¹ de L-treonina e esterilizada em alíquotas de 5 mL a 121°C por 10 min e estocada a 4°C.

Solução de sulfato de cobre

Uma solução de 20 mM de sulfato de cobre (II) foi preparada, filtrada e esterilizada em membrana de 0,2 µm esterilizada. A solução foi estocada a temperatura ambiente em frascos de vidro esterilizados.

Meio Mínimo

O meio mínimo (pH 7,1) foi preparado pela adição de 13,61 g de KH_2PO_4 , 1,98g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 4,2g de KOH peletes, 0,2g de MgSO_4 , 1 mL de solução de $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ (40 mg/50 mL H_2O), 50 mg de L-leucina, 50 mg de L-histidina, 50 mg de adenina, 20 mg de L-arginina-HCl, 20 mg de L-metionina, 30 mg de L-tirosina, 30 mg de L-isoleucina, 30 mg de L-lisina-HCl, 25 mg de L-fenilalanina, 100 mg de L-ácido glutâmico, 150 mg de L-valina, e 375 mg L-serina para 1 L de água. A solução foi armazenada em frascos de vidro, esterilizadas a 121°C por 10 min e estocadas em temperatura ambiente.

PREPARAÇÃO DO MEIO DE ANÁLISE

O meio de análise foi preparado pela adição de 250 μL do substrato cromogênico CPRG a 25 mL de meio de cultivo. O meio foi inoculado com 4×10^7 células de levedura de uma cultura.

Solução estoque de CPRG

A solução estoque de $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de CPRG foi preparada em água estéril estocada a 4°C em frascos de vidro esterilizados.

ANEXO B – DADOS EXPERIMENTAIS DOS ENSAIOS DE TOXICIDADE AGUDA E CRÔNICA

Tabela B.1 - Resultados experimentais do teste de toxicidade aguda para os Efluentes Primário e Secundário

Concentração (%)	N° de organismos inicial	Efluente Primário		Efluente Secundário	
		N° de organismos mortos		N° de organismos mortos	
		Teste 1	Teste 2 (repetição)	Teste 1	Teste 2 (repetição)
Amostra 1					
Controle	20	1	0	0	0
6,25	20	0	0	0	0
12,5	20	0	0	0	0
25	20	0	0	0	0
50	20	0	0	0	1
75	20	0	1	1	0
100	20	1	1	0	1
Amostra 2					
Controle	20	0	0	0	0
6,25	20	0	0	0	0
12,5	20	0	0	1	0
25	20	0	0	0	0
50	20	0	0	0	1
75	20	0	1	1	0
100	20	1	0	0	0
Amostra 3					
Controle	20	0	0	0	0
6,25	20	0	1	0	0
12,5	20	0	0	0	0
25	20	0	0	0	0
50	20	0	0	0	0
75	20	0	0	0	1
100	20	0	2	2	0
Amostra 4					
Controle	20	0	1	0	0
6,25	20	0	0	0	0
12,5	20	1	0	1	0
25	20	0	0	0	0
50	20	0	0	1	1
75	20	0	0	0	0
100	20	2	0	0	0
Amostra 5					
Controle	20	2	0	0	0
6,25	20	0	0	1	0
12,5	20	0	0	0	0
25	20	0	0	0	0
50	20	0	0	0	0
75	20	0	0	1	0
100	20	1	1	0	1

Tabela B.2 - Resultados experimentais do teste de toxicidade crônica com a alga verde *Pseudokirchneriella subcapitata* para o Efluente Primário

Concentração (%)	Concentração (células alga/mL)									
	Amostra 1		Amostra 2		Amostra 3		Amostra 4		Amostra 5	
Controle	3186667		3186667		3620000		3553333		4620000	
	2953333	3097778	3120000	3175556	3686667	3697778	3120000	3308889	4753333	4475556
	3153333		3220000		3786667		3253333		4053333	
12.5	1786667		1720000		653333		386667		2586667	
	1886667	1797778	1520000	1564444	786667	675556	620000	475556	3853333	3431111
	1720000		1453333		586667		420000		3853333	
25	1586667		1620000		386667		86667		1253333	
	1653333	1575556	1686667	1664444	353333	353333	286667	364444	1253333	1275556
	1486667		1686667		320000		720000		1320000	
50	1586667		1453333		1786667		1686667		1020000	
	1520000	1453333	986667	1186667	1286667	1531111	1420000	1542222	1053333	975556
	1253333		1120000		1520000		1520000		853333	
75	853333		920000		2220000		2120000		1620000	
	886667	797778	820000	842222	2153333	2120000	1986667	1864444	1486667	1531111
	653333		786667		1986667		1486667		1486667	
100	1386667		1220000		2820000		3153333		1486667	
	1053333	1231111	1520000	1431111	2986667	3064444	3620000	3175556	1620000	1520000
	1253333		1553333		3386667		2753333		1453333	

Tabela B.3 - Resultados experimentais do teste de toxicidade crônica com a alga verde *Pseudokirchneriella subcapitata* para o Efluente Secundário

Concentração (%)	Concentração (células alga/mL)									
	Amostra 1		Amostra 2		Amostra 3		Amostra 4		Amostra 5	
Controle	3186667		2386667		3620000		2886667		4620000	
	2953333	3097778	2353333	2453333	3686667	3697778	3420000	2997778	4753333	4475556
	3153333		2620000		3786667		2686667		4053333	
12.5	2053333		1886667		3686667		3653333		4620000	
	2086667	2053333	2253333	2020000	3520000	3531111	3753333	3597778	3820000	4264444
	2020000		1920000		3386667		3386667		4353333	
25	1453333		1220000		1820000		1820000		3553333	
	1120000	1297778	1286667	1231111	2686667	2342222	2686667	2286667	2986667	3075556
	1320000		1186667		2520000		2353333		2686667	
50	320000		353333		1753333		1720000		1920000	
	386667	420000	286667	320000	1920000	1931111	2320000	2020000	2053333	1775556
	553333		320000		2120000		2020000		1353333	
75	653333		586667		1586667		1553333		653333	
	720000	586667	420000	486667	1386667	1542222	1220000	1208889	553333	564444
	386667		453333		1653333		853333		486667	
100	53333		20000		1053333		920000		-1280000	
	253333	164444	20000	31111	920000	908889	753333	720000	-846667	-1013333
	186667		53333		753333		486667		-913333	

Tabela B.4 - Resultados experimentais do teste de toxicidade crônica com a alga verde *Pseudokirchneriella subcapitata* para o Efluente Secundário após ajuste de pH

Concentração (%)	Concentração (células alga/mL)											
	pH=3						pH=11					
	Amostra 1		Amostra 2		Amostra 3		Amostra 4		Amostra 5		Amostra 1	
Controle	3186667		3020000		3020000		3186667		3020000		3020000	
	2820000	2953333	3153333	3086667	2620000	2842222	2820000	2953333	3153333	3086667	2620000	2842222
	2853333		3086667		2886667		2853333		3086667		2886667	
12.5	3453333		3686667		2786667		2720000		2653333		2253333	
	3153333	3208889	3520000	3842222	2853333	2731111	2753333	2720000	2486667	2620000	2153333	2220000
	3020000		4320000		2553333		2686667		2720000		2253333	
25	3320000		3253333		1553333		1986667		1920000		820000	
	3186667	3320000	3520000	3275556	1820000	1764444	2053333	2064444	1320000	1464444	720000	942222
	3453333		3053333		1920000		2153333		1153333		1286667	
50	3086667		3120000		686667		1053333		1253333		520000	
	2286667	2720000	2286667	2386667	786667	686667	1020000	975556	720000	753333	686667	775556
	2786667		1753333		586667		853333		286667		1120000	
75	1720000		1753333		53333		286667		120000		20000	
	1653333	1664444	986667	1286667	253333	153333	20000	131111	120000	108889	586667	220000
	1620000		1120000		153333		86667		86667		53333	
100	486667		253333		153333		120000		-46667		20000	
	453333	475556	220000	242222	120000	108889	220000	220000	53333	-24444	53333	108889
	486667		253333		53333		320000		-80000		253333	

Tabela B.5 - Resultados experimentais do teste de toxicidade crônica com a alga verde *Pseudokirchneriella subcapitata* para o Efluente Secundário após filtração em membrana de fibra de vidro

Concentração (%)	Concentração (células alga/mL)					
	Amostra 3		Amostra 4		Amostra 5	
Controle			3020000		1886667	
		3131111	3153333	3086667	2020000	2064444
			3086667		2286667	
12.5			2753333		1486667	
		2808889	2486667	2620000	1720000	1420000
			2720000		1053333	
25			2486667		2086667	
		2397778	1320000	1464444	2453333	2108889
			1153333		1786667	
50			1953333		853333	
		2008889	720000	753333	653333	753333
			286667		NA	
75			1253333		320000	
		1308889	120000	108889	320000	320000
			86667		NA	
100			1353333		320000	
		1353333	53333	-24444	1153333	642222
			-80000		453333	

Tabela B.6 - Resultados experimentais do teste de toxicidade crônica com a alga verde *Pseudokirchneriella subcapitata* para o Efluente Secundário após aeração

Concentração (%)	Concentração (células alga/mL)					
	Amostra 3		Amostra 4		Amostra 5	
Controle			3020000		1886667	
		3264444	1886667	2097778	2020000	2064444
			2120000		2286667	
12.5			3786667		1653333	
		4153333	4053333	4064444	2153333	2064444
			4653333		2386667	
25			4953333		2186667	
		4653333	4120000	4164444	520000	586667
			3453333		653333	
50			2386667		2020000	
		2331111	1753333	1975556	2153333	2331111
			1753333		2820000	
75			186667		553333	
		475556	1053333	775556	620000	642222
			1053333		753333	
100			1086667		520000	
		853333	286667	564444	520000	553333
			253333		620000	

Tabela B.7 - Resultados experimentais do teste de toxicidade crônica com a alga verde *Pseudokirchneriella subcapitata* para o Efluente Secundário após extração

Concentração (%)	Concentração (células alga/mL)					
	Amostra 3		Amostra 4		Amostra 5	
Controle	2986667		2953333		3153333	
	2953333	3020000	3153333	3153333	3253333	3186667
	3120000		3353333		3153333	
12.5	3320000		3320000		3353333	
	3320000	3353333	3653333	3297778	3586667	3408889
	3420000		2920000		3286667	
25	2620000		2353333		2553333	
	2720000	2742222	2586667	2742222	2820000	2797778
	2886667		3286667		3020000	
50	3553333		3520000		3553333	
	3820000	3653333	3686667	3686667	3820000	3675556
	3586667		3853333		3653333	
75	3386667		3286667		3320000	
	3586667	3531111	3686667	3620000	3653333	3597778
	3620000		3886667		3820000	
100	1820000		1820000		1486667	
	1653333	1664444	1520000	1608889	1653333	1531111
	1520000		1486667		1453333	

Tabela B.8 - Resultados experimentais do teste de toxicidade crônica com a alga verde *Pseudokirchneriella subcapitata* para o Efluente Secundário após extração em fase sólida – analito

Concentração (%)	Concentração (células alga/mL)					
	Amostra 3		Amostra 4		Amostra 5	
Controle	2953333		3020000		2086667	
	2820000	2908889	3053333	3053333	2020000	1964444
	2953333		3086667		1786667	
12.5	2353333		2586667		1420000	
	2686667	2464444	2720000	2653333	1786667	1564444
	2353333		2653333		1486667	
25	1953333		2453333		2186667	
	1886667	1986667	2720000	2520000	2253333	2164444
	2120000		2386667		2053333	
50	1520000		1653333		853333	
	1720000	1664444	1586667	1720000	720000	786667
	1753333		1920000		886667	
75	653333		1253333		353333	
	720000	875556	1253333	1220000	220000	286667
	1253333		1153333		386667	
100	520000		853333		486667	
	620000	608889	986667	875556	686667	497778
	686667		786667		320000	

Tabela B.9 - Resultados experimentais do teste de toxicidade crônica com a alga verde *Pseudokirchneriella subcapitata* para o Efluente Secundário após quelação com EDTA

Concentração (%)	Concentração (células alga/mL)					
	Amostra 3		Amostra 4		Amostra 5	
Controle	2953333		1653333		1886667	
	2820000	2908889	2020000	1786667	2020000	2064444
	2953333		1686667		2286667	
12.5	2353333		1586667		1486667	
	2686667	2464444	1886667	1853333	1720000	1420000
	2353333		2086667		1053333	
25	1953333		1120000		2086667	
	1886667	1986667	1453333	1208889	2453333	2108889
	2120000		1053333		1786667	
50	1520000		620000		853333	
	1720000	1664444	586667	597778	653333	753333
	1753333		586667		NC	
75	653333		353333		320000	
	720000	875556	453333	464444	320000	320000
	1253333		586667		NC	
100	520000		353333		320000	
	620000	608889	186667	231111	1153333	642222
	686667		153333		453333	

Tabela B.10 - Resultados experimentais do teste de toxicidade crônica com a alga verde *Pseudokirchneriella subcapitata* para o Efluente Secundário após ozonização

Concentração (%)	Concentração (células alga/mL)					
	Amostra 3		Amostra 4		Amostra 5	
Controle	2953333		2953333		3153333	
	2820000	2908889	3153333	3153333	3253333	3186667
	2953333		3353333		3153333	
12.5	5153333		5153333		3420000	
	4886667	4708889	4886667	4708889	3553333	3475556
	4086667		4086667		3453333	
25	5086667		5086667		2586667	
	5953333	5675556	5953333	5675556	2820000	2786667
	5986667		5986667		2953333	
50	5986667		5986667		3486667	
	4720000	5908889	4720000	5908889	3653333	3608889
	7020000		7020000		3686667	
75	5053333		5053333		3686667	
	4386667	4686667	4386667	4686667	3453333	3553333
	4620000		4620000		3520000	
100	4353333,3		4353333,3		1586666,7	
	4153333,3	4097778	4153333,3	4097778	1453333,3	1497778
	3786666,7		3786666,7		1453333,3	

Tabela B.11 - Resultados experimentais do teste de toxicidade crônica com *Ceriodaphnia dubia* para o Efluente Primário e Secundário

Efluente Primário																							
Amostra 4												Amostra 5											
Concentr.	Nº de neonatos										Fêmea sobrev.	Concentr.	Nº de neonatos (repetição)										Fêmea sobrev.
	1	2	3	4	Fêmea sobrev.	6	7	8	9	10			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Controle	12	13	12	8	12	10	11	9	9	13	10	Controle	9	10	9	9	10	11	12	M	8	9	9
6,25%	7	0	M	12	9	8	11	10	13	M	8	6,25%	7	8	7	8	9	M	6	8	8	10	9
12,50%	15	12	8	9	5	8	7	10	11	M	9	12,50%	8	M	3	6	8	10	8	6	9	7	9
25%	M	8	1	5	9	3	9	6	6	0	9	25%	6	M	8	7	M	7	11	9	6	5	8
50%	7	M	5	M	4	6	7	3	M	0	7	50%	9	M	4	6	7	7	8	M	7	0	8
75%	10	1	4	7	5	4	9	M	0	7	9	75%	5	6	8	5	6	M	6	2	7	4	9
100%	6	3	5	6	8	0	0	8	8	M	8	100%	M	4	3	5	M	4	3	2	M	4	7

Efluente Secundário																							
Amostra 4												Amostra 5											
Concentr.	Nº de neonatos										Fêmea sobrev.	Concentr.	Nº de neonatos (repetição)										Fêmea sobrev.
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Controle	12	13	12	8	12	10	11	9	9	13	10	Controle	10	9	M	9	10	11	12	9	9	7	9
6,25%	9	M	10	11	8	12	9	13	10	0	9	6,25%	M	7	8	9	10	10	9	8	7	11	9
12,50%	M	11	8	7	M	10	12	7	8	11	8	12,50%	7	4	5	8	11	M	7	6	0	9	9
25%	13	8	8	M	5	10	5	7	9	0	9	25%	8	6	M	7	M	9	10	5	9	8	8
50%	M	8	M	5	10	12	4	8	7	6	8	50%	5	7	9	10	11	8	M	7	6	6	9
75%	3	2	5	7	7	8	7	2	0	9	10	75%	M	7	0	8	7	6	0	0	5	3	9
100%	1	M	4	0	M	0	7	8	6	M	7	100%	3	2	1	1	M	M	4	0	5	M	7

Tabela B.12 - Resultados experimentais do teste de toxicidade crônica com *Ceriodaphnia dubia* para o Efluente Secundário após ajuste do pH

pH = 3																							
Amostra 4											Amostra 5												
Concentr.	Nº de neonatos										Fêmea sobrev.	Concentr.	Nº de neonatos (repetição)										Fêmea sobrev.
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Controle	8	10	11	9	11	10	12	M	M	10	8	Controle	10	9	8	9	10	11	12	9	9	7	10
6,25%	11	12	10	11	9	8	8	12	M	9	9	6,25%	11	8	9	8	10	9	7	11	12	8	10
12,50%	M	10	8	7	9	11	10	0	7	10	9	12,50%	8	7	0	9	8	10	11	0	9	10	10
25%	9	8	8	7	9	5	6	7	8	M	9	25%	M	9	8	7	11	7	10	10	6	7	9
50%	M	4	4	6	7	5	0	M	6	M	7	50%	7	9	10	6	M	7	8	M	7	0	8
75%	6	7	7	0	M	8	9	9	M	0	8	75%	9	6	7	M	6	5	3	0	7	8	9
100%	0	6	0	5	4	M	M	0	0	7	8	100%	5	3	3	6	M	4	2	1	M	5	8

pH = 11																							
Amostra 4											Amostra 5												
Concentr.	Nº de neonatos										Fêmea sobrev.	Concentr.	Nº de neonatos (repetição)										Fêmea sobrev.
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Controle	7	10	12	13	11	11	10	9	8	11	10	Controle	10	8	9	7	11	12	M	9	10	10	9
6,25%	10	M	12	6	10	11	12	9	0	14	9	6,25%	8	8	9	11	M	5	10	7	6	0	9
12,50%	9	8	8	7	10	11	12	M	0	8	9	12,50%	7	7	8	10	9	6	M	6	7	8	9
25%	12	5	6	6	8	7	10	9	9	M	9	25%	6	M	8	8	10	M	7	8	6	9	8
50%	M	0	8	12	10	9	M	8	11	9	8	50%	M	5	6	0	M	8	7	0	8	6	8
75%	0	2	10	8	7	5	4	9	6	8	10	75%	5	5	7	8	8	0	M	4	6	6	9
100%	3	0	M	M	7	6	5	4	4	M	7	100%	4	4	3	M	M	0	5	M	3	6	7

Tabela B.13 - Resultados experimentais do teste de toxicidade crônica com *Ceriodaphnia dubia* para o Efluente Secundário após aeração

Amostra 4												Amostra 5											
Concentr.	Nº de neonatos										Fêmea sobrev.	Concentr.	Nº de neonatos (repetição)										Fêmea sobrev.
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Controle	9	8	8	11	7	8	14	7	9	11	10	Controle	9	10	11	9	10	M	12	11	9	9	9
6,25%	0	12	6	7	10	0	5	9	8	10	10	6,25%	8	8	7	M	9	9	6	8	11	10	9
12,50%	8	M	7	10	11	9	8	M	7	12	8	12,50%	8	M	0	9	8	10	11	0	9	10	9
25%	M	8	11	7	6	6	0	8	10	8	9	25%	6	9	8	7	M	7	10	10	6	7	9
50%	M	3	6	8	10	9	8	7	6	0	9	50%	M	9	10	6	M	7	8	10	7	0	8
75%	8	5	4	M	8	4	6	M	2	0	8	75%	7	6	8	M	6	5	6	0	7	8	9
100%	5	0	0	8	6	M	3	M	3	4	8	100%	5	4	3	M	5	M	3	2	M	4	7

Tabela B.14 - Resultados experimentais do teste de toxicidade crônica com *Ceriodaphnia dubia* para o Efluente Secundário após filtração em membrana de fibra de vidro

Amostra 4												Amostra 5											
Concentr.	Nº de neonatos										Fêmea sobrev.	Concentr.	Nº de neonatos (repetição)										Fêmea sobrev.
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Controle	9	8	8	11	7	8	14	7	9	M	9	Controle	9	10	8	7	M	9	7	8	10	M	8
6,25%	9	10	10	8	9	M	10	8	7	11	9	6,25%	9	7	10	11	0	8	7	M	9	11	9
12,50%	8	0	5	9	8	7	M	M	7	9	8	12,50%	8	9	9	10	11	8	M	7	6	10	9
25%	M	6	6	10	8	4	M	0	7	4	8	25%	8	7	6	7	10	8	6	7	5	6	10
50%	1	4	0	8	8	5	10	0	8	4	10	50%	M	7	6	5	8	5	5	3	0	0	8
75%	5	5	M	4	6	7	5	9	M	0	8	75%	3	4	M	6	7	4	8	10	7	M	9
100%	6	4	3	M	M	1	0	7	0	2	7	100%	3	1	1	M	2	4	3	0	M	1	8

Tabela B.15 - Resultados experimentais do teste de toxicidade crônica com *Ceriodaphnia dubia* para o Efluente Secundário após extração em fase sólida

Amostra 4												Amostra 5											
Concentr.	Nº de neonatos										Fêmea sobrev.	Concentr.	Nº de neonatos (repetição)										Fêmea sobrev.
	1	2	3	4	6	7	8	9	10	M			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Controle	10	11	9	12	11	8	9	10	10	M	9	Controle	10	9	M	9	10	11	12	9	9	7	9
6,25%	7	10	9	9	8	6	11	10	9	8	10	6,25%	12	13	9	8	10	9	9	11	12	8	10
12,50%	11	7	8	M	10	12	8	6	9	10	9	12,50%	7	10	11	9	8	10	11	0	9	10	10
25%	8	7	8	11	M	9	0	11	6	7	9	25%	9	10	8	7	11	7	10	M	11	5	9
50%	9	M	10	8	8	7	11	10	9	8	9	50%	8	10	M	10	6	8	8	M	9	0	8
75%	11	8	7	7	6	9	10	7	6	8	10	75%	M	6	6	5	4	8	0	0	7	9	9
100%	7	8	0	10	M	4	M	6	0	4	8	100%	4	4	3	M	M	6	4	1	2	5	8

Tabela B.16 - Resultados experimentais do teste de toxicidade crônica com *Ceriodaphnia dubia* para o Efluente Secundário após extração em fase sólida – analito

Amostra 4												Amostra 5											
Concentr.	Nº de neonatos										Fêmea sobrev.	Concentr.	Nº de neonatos (repetição)										Fêmea sobrev.
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Controle	10	11	9	12	11	8	9	10	10	M	9	Controle	11	10	11	7	M	9	8	8	9	M	8
6,25%	8	9	5	10	8	8	7	6	M	7	9	6,25%	M	7	8	11	0	8	7	8	9	11	9
12,50%	8	0	10	M	7	6	6	5	8	10	9	12,50%	8	9	9	10	M	8	7	7	6	10	9
25%	7	6	5	6	4	M	8	7	7	0	9	25%	8	7	10	7	10	M	6	7	M	6	8
50%	6	6	5	0	M	M	8	6	4	4	8	50%	10	7	6	6	M	5	M	3	0	6	8
75%	4	3	5	M	6	7	10	5	4	8	9	75%	3	4	0	6	M	4	8	5	7	3	9
100%	0	0	M	5	5	4	M	3	1	M	7	100%	3	1	M	3	2	5	3	0	4	M	8

Tabela B.17 - Resultados experimentais do teste de toxicidade crônica com *Ceriodaphnia dubia* para o Efluente Secundário após queelação com EDTA

Amostra 4												Amostra 5											
Concentr.	Nº de neonatos										Fêmea sobrev.	Concentr.	Nº de neonatos (repetição)										Fêmea sobrev.
	1	2	3	4	6	7	8	9	10	1			2	3	4	5	6	7	8	9	10		
Controle	M	10	9	11	12	8	10	11	M	12	8	Controle	37	38	35	38	34	33	34	35	36	36	10
6,25%	8	7	10	9	M	9	11	12	8	7	9	6,25%	35	34	33	0	34	37	35	34	32	33	9
12,50%	10	9	7	6	9	M	6	7	8	8	9	12,50%	0	29	28	30	31	0	31	31	29	33	8
25%	3	M	6	8	10	M	6	7	7	8	8	25%	0	27	27	28	25	27	29	24	0	30	8
50%	7	3	4	0	8	10	6	5	6	M	9	50%	24	23	25	24	22	22	0	23	24	27	9
75%	7	M	5	9	6	0	M	9	4	6	8	75%	23	22	22	21	20	0	25	0	21	24	8
100%	M	3	M	1	2	6	6	M	5	0	7	100%	20	0	0	19	17	0	22	16	16	21	7

Tabela B.18 - Resultados experimentais do teste de toxicidade crônica com *Ceriodaphnia dubia* para o Efluente Secundário após ozonização

Amostra 4												Amostra 5											
Concentr.	Nº de neonatos										Fêmea sobrev.	Concentr.	Nº de neonatos (repetição)										Fêmea sobrev.
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Controle	12	10	11	4	12	7	11	9	10	12	10	Controle	10	11	9	9	8	10	11	10	9	7	10
6,25%	10	8	11	12	9	9	7	10	11	8	10	6,25%	7	10	11	8	8	10	9	8	10	11	10
12,50%	11	9	10	9	11	12	9	M	7	9	9	12,50%	8	M	7	10	9	11	12	10	9	8	9
25%	9	9	9	7	0	10	11	8	8	10	10	25%	7	10	8	8	7	M	9	10	11	7	9
50%	6	11	M	10	8	7	9	9	11	10	9	50%	M	7	6	10	9	10	8	8	9	6	9
75%	7	11	10	12	9	9	M	8	8	6	9	75%	M	10	8	9	11	9	8	7	0	9	8
100%	8	M	6	8	7	M	0	8	8	7	8	100%	5	6	9	7	10	M	M	6	5	3	7

ANEXO C – DADOS EXPERIMENTAIS DOS TRATAMENTOS COM OZÔNIO

Tabela C.1 - Resultados experimentais do teste de toxicidade crônica com a alga verde *Pseudokirchneriella subcapitata* para o Efluente Primário

Parâmetros analisadas	Amostra 1		Amostra 2		Amostra 3		Amostra 4		Amostra 5	
	Inicial	Tra.Ozônio	Inicial	Tra.Ozônio	Inicial	Tra.Ozônio	Inicial	Tra.Ozônio	Inicial	Tra.Ozônio
pH	8,79	8,64	8,1	8,64	8,34	8,6	8,4	8,7	8,16	8,6
DQO (mgO ₂ .L ⁻¹)	313	193	231	176	287	195	285	181	202	149
DBO ₅ (mgO ₂ . L ⁻¹)	42	38	55	58	55	63	63	60	10	16
Relação DBO/DQO	0,13	0,20	0,24	0,33	0,19	0,32	0,22	0,33	0,05	0,11
COT (mgC L ⁻¹)	67	51	48	38	59	47	NC	NC	NA	NA
Carboidratos (mg glicose.L ⁻¹)	31	29	34	31	42	38	46	46	31	25
Lignina (mg fenol.L ⁻¹)	18	4	22	5	19	5	24	7	15	4
Cor (mg Pt.L ⁻¹)	899	436	912	417	981	427	851	401	403	180

Inicial = caracterização do efluente secundário

Trat.Ozônio = caracterização do efluente secundário após o tratamento com ozônio