

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA

Dissertação de Mestrado

Potencial tóxico e mutagênico de efluentes tratados de indústria metal mecânica dispostos no
solo

DANIELE GERVAZONI VIANA DAS NEVES

Porto Alegre, 17 de janeiro de 2014

Potencial tóxico e mutagênico de efluentes tratados de uma indústria metal mecânica
dispostos no solo

Daniele Gervazoni Viana das Neves

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia, do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ecologia.

Orientador: Prof. Dra. Vera M^a Ferrão Vargas

Comissão Examinadora

Prof. Dra. Helena Campos Rolla

Prof. Dra. Kelly Cristina Tagliari de Brito

Prof. Dra. Teresinha Guerra

Porto Alegre, 17 de janeiro de 2014

Dedico este trabalho a meu avô e ao meu pai,
homens que sempre gostaram dos livros e do saber.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela força, saúde e equilíbrio!

À minha família apoio incondicional, tentando muitas vezes entender a finalidade do meu trabalho e me dando força quando pensava em desistir.

Ao meu marido pela paciência no final do trabalho.

À minha naturoterapeuta Rosa pelas energias que me faziam progredir quando não sabia mais de onde tirar força.

À minha orientadora Vera Maria Ferrão Vargas, por todo carinho, apoio e orientação durante a extensa caminhada, merecendo toda admiração por seu comprometimento com a qualidade das pesquisas, competência absoluta e dedicação em tudo que faz! Obrigada!!

Aos amigos de perto e de longe, pelas palavras de encorajamento.

Aos funcionários, bolsistas e estagiários da Divisão de Biologia da FEPAM.

À Roberta, Paula, Mariana, e Andréia do Lab. de Mutagênese que me ensinaram o teste e auxiliaram sempre que precisei.

À minha parceira de testes: Cris, muito obrigada por tudo....pelos testes nos feriados, pelos desabafos, risos de agonia e sua paciência!!

À Tita, obrigada por todo esforço, dedicação, palavras de encorajamento e prontidão pra ajudar sempre.

À Juliana, por ler e dar um toque especial ao que ficava tosco!

À equipe de estagiários que trabalhou comigo no lab.de mutagênese: Aline, Bárbara, Kauê e Tamara.

À Bibiana nos momentos finais do trabalho com ajuda nos textos de pesquisa e envio de material para análise.

À outros colegas que já passaram pelo Lab.: Natália, Valéria.

À todos os meus colegas do Instituto Federal Sul Rio grandense pela ajuda e carinho.

À Giane e Yuri por seus conhecimentos específicos.

À equipe de amostragem da FEPAM: Cledion pela organização e competência e ao Gilson pela marcação de amostragem, mesmo próximo ao Natal!

Aos engenheiros da FEPAM: Fernando e Diego pela disponibilidade dos dados do processo de licenciamento da indústria de estudo, acompanhamento e contato durante a visita de avaliação.

Aos profissionais da indústria metal mecânica que nos forneceram várias informações sobre o processo de tratamento e aspersão do efluente: Daniel, Roc, Ismael e Marlon.

Ao Instituto Federal Rio-Grandense, principalmente ao Campus Sapucaia do Sul.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

RESUMO

Os efluentes contêm misturas complexas de compostos químicos orgânicos e inorgânicos além de metais pesados que possam representar uma grave fonte de poluição para os ecossistemas, assim como para a saúde humana. O presente estudo teve como objetivo verificar a modificação das características físicas e químicas do efluente e do solo que recebe a aspersão diária desde janeiro de 2011; avaliar a toxicidade aguda, crônica e mutagênese do efluente final tratado de indústria metal mecânica além de analisar se os vegetais que recebem irrigação com efluente atuam como receptores ecológicos de metais pesados. Tanto para o efluente quanto para o solo foram realizadas análises físicas e químicas, comparadas com padrões de legislação. A maioria dos parâmetros de emissão do efluente para águas superficiais estava dentro dos padrões legais, com exceção dos níveis de N e P totais. Na análise do solo, valores mais elevados foram observados no solo irrigado (SI) para P, K e a maioria dos metais analisados, sendo que para Ni estiveram acima dos de referência considerando a legislação mais restritiva. A caracterização de metais nos vegetais mostrou concentrações maiores em SI em relação ao solo de referência (SR). As raízes de *Lolium multiflorum* apresentaram valores mais elevados do que os observados em folhas, principalmente em relação a Al, Fe, Ni, Zn, Cu, Cr e Pb. A toxicidade do efluente foi analisada em três níveis tróficos (*Ceriodaphnia dubia*; *Pimephales promelas* e *Pseudokirchneriella subcaptata*) com presença de efeito agudo e crônico para *C. dubia* e crônico para *P. subcaptata*. Ainda foram aplicados testes de sobrevivência e crescimento em *Oryza sativa*, *Raphanus sativus* e *Lactuca sativa* (plântulas) e *Eisenia fetida* (minhoca) onde o crescimento de *O. sativa* e *E. fetida* foram afetados; já no teste de ciclo de carbono e nitrogênio para microrganismos do solo a toxicidade foi ausente. O teste de fuga em SI com *Eisenia andrei* mostrou resposta negativa. A mutagênese das amostras de efluente e de solo foi avaliada no ensaio *Salmonella*/microsoma, método de microsuspenção, na presença e na ausência de metabolização (fração S9-homogenato de células de fígado de rato, S9). As linhagens utilizadas avaliaram erros no quadro de leitura TA98 e TA97a (sensível a metais pesados) e YG1041 e 1042 sem metabolização (sensível a nitrocompostos) e substituição de pares de bases TA100 e TA102 (sensível a danos oxidativos). As curvas dose-resposta foram avaliadas por análise de regressão e ANOVA (programa SALANAL). O efluente mostrou respostas significativas, com valores (revertentes/mL) de $510 \pm 151,8$ (TA97a-S9) e $780 \pm 136,9$ (TA100+S9). Para extratos orgânicos, os resultados foram indicativos de mutagênese para (TA97a+S9). A mutagênese dos extratos ácidos do solo mostrou respostas positivas ($92 \pm 31,7$ revertentes/mg de solo seco equivalente; TA97a+S9) e indicativas de mutagênese (TA100+S9). Os efeitos detectados indicam que compostos inorgânicos, como metais pesados, podem levar à toxicidade e mutagênese observada, além de se acumularem nos vegetais. Os estudos subsidiam medidas preventivas para legislação que contemple restrições ao lançamento de substâncias potencialmente poluidoras no solo, utilizando análises das dosagens químicas aliados a ensaios de toxicidade e genotoxicidade.

Palavras-chave: Efluente industrial, solo, análise física e química, efeito agudo e crônico, mutagenicidade.

ABSTRACT

The purpose of the present study was to evaluate acute and chronic toxicity and mutagenesis of the treated final effluent from the metallurgical industry; to look for the presence of the alterations detected in the effluent and in the soil that has been sprayed daily since January 2011; to evaluate plants as ecological receptors of heavy metals. Physical and chemical analyses were performed both for the effluent and for the soil, and compared with standards from legislation. Most of the emission parameters from the effluent to surface waters were within the legal standards, except for the levels of total N and P. Analyzing the soil higher values were observed in irrigated soil (SI) for P, K and most of the metals analyzed, and for Ni they were above those of reference considering the more restrictive legislation. The characterization of metals in the plants showed higher concentrations of SI compared to reference soil (SR). The roots of *Lolium multiflorum* presented higher values than those observed in leaves, especially for Al, Fe, Ni, Zn, Cu, Cr. and Pb. The effluent toxicity was analyzed at three trophic levels (*Ceriodaphnia dubia*; *Pimephales promelas* and *Pseudokirchneriella subcaptata*) with the presence of an acute and chronic effect for *C. dubia* and chronic for *P. subcaptata*. Survival and growth tests were also applied in *Oryza sativa*, *Raphanus sativus* and *Lactuca sativa* (plantules) and *Eisenia fetida* (worm) where the growth of *O. sativa* and *E. fetida* were affected; on the other hand, in the carbon cycle test and nitrogen for soil microorganisms, there was no toxicity. The avoidance test in SI with *Eisenia andrei* showed a negative response. The mutagenesis of the effluent and soil samples was evaluated in the *Salmonella*/microsome assay, microsuspension method, in the presence and absence of metabolization (S9 fraction – homogenate of rat liver cells, S9). The strains used evaluated frameshift errors TA98 and TA97a (sensitive to heavy metals), YG1041 and 1042 absence of metabolization (sensitive to nitrocompounds) and base pair substitution TA100 and TA102 (sensitive to oxidative damage). The dose-response curves were evaluated by regression analysis and ANOVA (SALANAL program). The effluent showed significant responses, with values (revertants/mL) of 510 ± 151.8 (TA97a-S9) and 780 ± 136.9 (TA100+S9). The results indicated mutagenesis for (TA97a+S9) for organic extracts. The mutagenesis of the acid soil extracts showed positive responses (92 ± 31.7 revertants/mg of dry soil equivalent; TA97a+ S9) and indicative of mutagenesis TA100+S9. The effects detected indicate that inorganic compounds, as heavy metals, can lead to the toxicity and mutagenesis observed, besides accumulating in the vegetable tissues. The studies subsidized preventative measures for legislation that considers restrictions to the discharge of potentially polluting substances on the soil, using analyses of the chemical doses together with toxicity and genotoxicity assays.

Key words: Industrial effluent, soil, physical and chemistry analysis, acute and chronic effects, mutagenicity.

SUMÁRIO

RESUMO.....	5
ABSTRACT	6
LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
LISTA DE FIGURAS.....	12
LISTA DE TABELAS	13
1 INTRODUÇÃO	14
Efluentes industriais	14
Dispersão do efluente	16
Compartimento ambiental: solo e suas características.....	16
Dispersão do efluente no solo	17
Acúmulo de metais em vegetais	18
Ensaio de ecotoxicidade.....	19
Ensaio que medem mutagênese ambiental.....	20
Legislações ambientais que regulamentam a dispersão de efluentes	22
Histórico nacional das análises quanto a disposição de efluente no solo	26
Informações preliminares relevantes sobre a área de estudo	28
2 ARTIGO CIENTÍFICO: Potencial tóxico e mutagênico de efluente de indústria metal mecânica disposto no solo	29
RESUMO	30
INTRODUÇÃO.....	31
MATERIAL E MÉTODOS.....	34
Área de estudo	34
Efluente industrial.....	35
Caracterização do solo.....	36
Delineamento amostral	36
Coleta de amostras de efluente tratado.....	36
Pontos de amostragem de solo	38
Procedimento de extração do efluente.....	Erro! Indicador não definido.
Procedimentos de extração do solo.....	40
Extração ácida de solos: extratos inorgânicos	40
Extração orgânica de solos	41
Quantificação de metais em extratos ácidos de solo	41

Amostragem de vegetais	42
Testes de toxicidade	43
Testes de toxicidade com efluente final tratado	43
Ensaio de ecotoxicidade aguda e crônica	43
Testes de toxicidade com solo.....	44
Ensaio de fuga de <i>Eisenia andrei</i>	44
Ensaio de genotoxicidade	45
Testes de <i>Salmonella/microsoma</i> : atividade mutagênica e citotóxica	45
Método de microssuspensão - Teste de Kado	45
Ensaio de Ames clássico de acordo com a norma ISO 16240 (2005).....	47
RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
Análises físicas e químicas	48
Parâmetros físico-químicos do efluente e das amostras de solo.....	49
Teores de metais no efluente tratado e no solo-receptor	53
Análise quantitativa de metais nos vegetais.....	56
Análise de compostos orgânicos no efluente e no solo	61
Compostos orgânicos voláteis e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos	61
Análise quantitativa de agrotóxicos no solo.....	62
Testes de toxicidade do efluente.....	63
Ensaio de toxicidade com organismos aquáticos e terrestres.....	63
Ensaio de fuga de minhocas (<i>Eisenia andrei</i>).....	68
Ensaio de genotoxicidade	69
Análises para avaliar mutagênese e citotoxicidade do efluente tratado.....	70
Ensaio <i>Salmonella/microsoma</i> : Teste de Kado.....	70
Teste de Ames clássico de acordo com a norma ISO16240/2008.....	73
Análises para avaliar mutagênese e citotoxicidade do solo	74
CONCLUSÃO	78
REFERÊNCIAS	80
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	87
REFERÊNCIAS	90
ANEXO A – Valores dos parâmetros físico-químicos do efluente tratado durante o ano de 2011 em coletas trimestrais, Licença de operação nº 0036/2011-DL.....	101
ANEXO B – Análise qualitativa dos compostos orgânicos presentes no efluente disperso no solo.....	102

ANEXO C – Análise dos 16 HPAs prioritários presentes no efluente	104
ANEXO D – Análises quantitativas de agrotóxicos no solo	105
ANEXO E – Tabela comparativa dos valores de sementes germinadas com adição de água deionizada (controle) e efluente tratado.	107
ANEXO F: Tabela comparativa entre o crescimento das plântulas com adição de água deionizada (controle) e efluente tratado.	108
ANEXO G – Taxa de consumo de glicose (μg de glicose/ g de solo – hora)	110
ANEXO H – Taxa de produção de nitratos (mg NO_3^- / kg solo. dia).....	111
ANEXO I – Resultado de toxicidade para o ciclo de carbono e nitrogênio	112
ANEXO J – Análise da mortalidade de <i>Eisenia fetida</i> com solo artificial umidificado com água deionizada no controle e efluente tratado na amostra.	113
ANEXO K – Peso dos organismos no início da exposição no ensaio de toxicidade aguda com <i>Eisenia fétida</i>.	114
ANEXO L – Peso dos organismos no final da exposição de toxicidade aguda com <i>Eisenia fetida</i>.	115

LISTA DE ABREVIATURAS

2AF – 2 - aminofluoreno

2NF – 2 - nitrofluoreno

4NQO – 4-oxidonitroquinolina

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS

ANOVA – Análise de Variância

APHA- American Public Health Association

AZS- azida sódica

CERH-MG – Conselho Estadual de Recursos Hídricos do Estado de Minas Gerais

CETEM- RJ – Centro de Tecnologia Mineral no Rio de Janeiro

CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, órgão ambiental do Estado de São Paulo

CONAMA - Conselho Nacional de Meio Ambiente

CONSEMA- RS – Conselho Estadual de Meio Ambiente do Rio Grande do Sul.

COPAM- MG– Conselho Estadual de Política Ambiental do estado de Minas Gerais

CTC – Capacidade de Troca Catiônica

DBO – Demanda Bioquímica de Oxigênio

DQO – Demanda Química de Oxigênio

DCM – Diclorometano

DMSO – Dimetilsulfóxido

FATMA – Fundação de Meio Ambiente do Estado de Santa Catarina

FEPAM – Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luís Roessler

FT – Fator de toxicidade

HNO₃ - ácido nítrico

HPAs/PAHs – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos

IAP – Instituto Ambiental do Paraná

IARC - International Agency For Research On Cancer

ICP-OES – Espectrometria de emissão óptica por plasma indutivamente acoplado.

ISO - Internation Organization for Standardization

MeOH – Metanol

MOE/EOM – Material orgânico extraído

NaOH – Hidróxido de sódio

OECD – Organization for Economic Cooperation and Development

S9 – fração de metabolização exógena

SAZ – azida sódica

SI – solo que recebe aspersão de efluente tratado através do processo de irrigação.

SR – solo com características similares ao SI, mas que não recebe efluente tratado.

UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

USEPA – Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos

XRF – espectrometria de fluorescência de raios-X

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Localização da área de estudo	35
Figura 2 - Pontos de amostragem de solo nos locais que recebem aspersão do efluente (A01, A02, A03 e A04) e no local PO a área de referência.....	39
Figura 3 - Número de revertentes/ml para as linhagens testadas frente ao efluente tratado bruto.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Amostragem e ensaios realizados com o material.....	37
Tabela 2 - Coordenadas geográficas dos pontos amostrais de coleta de solo de referência (SR), as quatro áreas do solo irrigado (SI), associados aos vegetais.....	39
Tabela 3 - Valores dos parâmetros físico-químicos encontrados no efluente industrial tratado, comparando-os com os padrões de lançamento em águas superficiais.....	49
Tabela 4 - Parâmetros físicos e químicos dos solos irrigados (SI) e de referência (SR).....	51
Tabela 5 - Teores de metais do efluente industrial tratado e padrões de lançamento em águas superficiais.....	53
Tabela 6 - Análise comparativa dos teores de metais no solo irrigado (SI) e de referência (SR) em relação a valores orientadores para solo recomendados em legislação.	54
Tabela 7 - Valores orientadores da CETESB para solo no Estado de São Paulo/2005 em relação aos metais de interesse.	55
Tabela 8 - Comparação dos teores de metais presentes em vegetais em relação aos níveis observados no solo.	57
Tabela 9 - Análise quantitativa de metais presentes nos vegetais e legislações que regulamentam os teores dessas substâncias em vegetais.....	61
Tabela 10 - Testes para medir toxicidade aguda e crônica para três níveis tróficos.	64
Tabela 11 - Resumo dos resultados dos testes de toxicidade do efluente, expressos em fator de toxicidade.....	65
Tabela 12 - Número de indivíduos por tipo de solo e média percentual entre as duas réplicas.	69
Tabela 13 - Análise da mutagênese do efluente final tratado por teste de Kado.....	72
Tabela 14- Resultados de mutagenicidade para efluente de acordo com o teste clássico de Ames (ISO16240).....	74
Tabela 15 - Resumo dos resultados de mutagenicidade obtidos nas análises de extratos do solo irrigado.....	76
Tabela 16 - Resumo dos resultados de mutagenicidade obtidos nas análises de extratos do solo de referência.....	77

1 INTRODUÇÃO

O crescente desenvolvimento industrial tem liberado para o meio ambiente uma gama de substâncias químicas como subprodutos de seus processos produtivos, sob a forma de resíduos e efluentes (ALEEM & MALIK, 2003).

A destinação adequada dos efluentes industriais é uma constante preocupação para os órgãos de defesa ambiental, fazendo com que as indústrias para obterem os licenciamentos de operação invistam cada vez mais em tecnologias para se adequarem aos limites estabelecidos por normas e leis de proteção ambiental. Porém, as substâncias presentes no efluente ao serem liberadas no ambiente reagem formando misturas complexas. Nestas, os agentes perigosos e reativos, podem estar em menores concentrações. Dessa forma, associar às análises físicas e químicas à ensaios que medem efeitos ecotoxicológicos e genotóxicos pode contribuir na definição do impacto dessas misturas nos ecossistemas e os reflexos na saúde humana (CLAXTON et al., 1998; BRACK, 2003; WHITE & CLAXTON, 2004).

Estas análises são ferramentas cada vez mais utilizadas em estudos de impacto ambiental permitindo um diagnóstico mais detalhado, prevenindo a contaminação dos corpos hídricos e solos receptores. Portanto, existe uma tendência internacional crescente em incluir os bioensaios nas leis ambientais para monitorar e controlar a dispersão de efluentes industriais de modo a garantir um ambiente mais saudável para as gerações atuais e futuras (WILLIAMS et al., 1993; TERRA et al., 2009).

1.1 Efluentes industriais

Resíduos e efluentes industriais são indesejáveis subprodutos dos avanços tecnológicos e desenvolvimento econômico (HOUK, 1992; ALEEM & MALIK, 2003).

Quando ocorre a disposição inadequada de efluentes, a liberação dos compostos químicos potencialmente tóxicos provoca a poluição do meio em que foi disposto e pode induzir danos à saúde (HOUK,1992; COURTY et al., 2004).

Para avaliar os possíveis danos que o lançamento de efluentes industriais pode causar ao ambiente, diversas empresas limitavam-se a análise de seus parâmetros físicos e químicos. Este tipo de avaliação, embora forneça dados importantes simplificando as medidas de controle e remediação, não avalia de forma completa a contaminação ambiental (SILVA JÚNIOR & VARGAS, 2007). A limitação desta abordagem é a falta de avaliação das propriedades toxicológicas destes poluentes de forma isolada ou combinada com outras substâncias, possível somente através da realização de bioensaios (ALEEM & MALIK, 2003).

Um número elevado de substâncias químicas são diariamente utilizadas, sendo que a produção, distribuição, uso e disposição final desses produtos químicos levam a disponibilização e/ou acúmulo destes no ambiente. Após liberadas, essas substâncias podem sofrer transformações ao serem transportadas ou permanecerem estáveis por longos períodos, sendo difíceis de serem degradadas. Dessa forma, a maioria desses compostos podem persistir no ambiente, sofrer biotransformação e/ou bioacumulação, interferindo no fluxo de energia e nutrientes da cadeia biológica (HOLT, 2000; TAGLIARI et al., 2004).

Os efluentes, como misturas complexas de compostos químicos orgânicos e inorgânicos, apresentam uma resposta tóxica resultante de interações aditivas, sinérgicas ou antagônicas entre os agentes presentes (LAMBOLEZ et al., 1994; SINGH et al., 2007).

1.2 Dispersão do efluente

Tradicionalmente, os efluentes industriais são dispostos em recursos hídricos, havendo legislação que regulamenta e padroniza esta atividade, CONAMA nº 430 (BRASIL, 2011), porém cada vez mais eleva a demanda, nos órgãos de controle ambiental, para o licenciamento da disposição no solo.

É recorrente o relato de tratamento inadequado de efluentes que, ao serem dispostos nos recursos hídricos, causaram modificações físicas e químicas nos corpos d'água e muitas vezes mortandade em massa dos animais aquáticos que habitam o local. Alguns destes corpos hídricos estão de tal forma impactados, que não possuem mais a capacidade de receber o lançamento de efluentes necessitando, neste estágio, de um plano de recuperação ambiental. Com a demanda crescente de solicitações de licenciamentos para irrigação com águas residuais e efluentes de indústrias ou ainda aplicação de lodo de esgotamento sanitário no solo, torna-se necessário avaliar, criteriosamente, os riscos ambientais de tais empreendimentos para evitar a necessidade de medidas posteriores de remediação neste compartimento ambiental.

1.3 Compartimento ambiental: solo e suas características

O solo tem como principal uso a produção de alimento, mas sua importância está muito além desta função. Ele pode agir como um filtro para várias substâncias, degradando resíduos, sendo uma fonte importante de nutrientes e gases através da atividade biológica (STENBERG, 1999; DORAN & ZEISS, 2000; SILVA JÚNIOR & VARGAS, 2009).

Em todos os compartimentos ambientais podem ser encontrados compostos tóxicos e/ou mutagênicos, porém o solo por receber água das chuvas que traz compostos presentes do

ar, irrigação natural e artificial e a própria deposição de substâncias presentes na atmosfera, tende à acumulação destas substâncias (FERNÁNDEZ et al., 2005). Como o solo é o compartimento ambiental utilizado para cultivo de alimentos, as questões ligadas aos aspectos de produtividade agrônômica sempre foram bem estudadas e padronizadas. No entanto, existe um alerta para a realização de estudos focando a contaminação deste compartimento ambiental (ALEEM & MALIK, 2003).

O uso de herbicidas, fungicidas e inseticidas tem contribuído para a contaminação de áreas rurais e agrícolas (WATANABLE & HIRAYAMA, 2001). Adicionalmente, as combinações de atividades, incluindo queima de combustíveis fósseis, deposição superficial de produtos da combustão, disposição de resíduos sólidos e de incineração, têm contribuído para a contaminação de solos nas áreas urbanas (WHITE & CLAXTON, 2004).

Um padrão para definir os melhores testes para avaliar o risco de contaminação ecológica deve ser embasado num contexto histórico da utilização da área, visando identificar as possíveis fontes de contaminação para orientar as pesquisas futuras (SCOTT-FORDSMAND et al., 2000; FERNANDÉZ, 2005).

1.4 Dispersão do efluente no solo

A disposição intencional de resíduos industriais no solo tem como justificativa a capacidade deste em reter e degradar os poluentes tóxicos. Entretanto, informações imprecisas sobre a toxicidade dos resíduos e um manejo inadequado da disposição dos mesmos podem resultar em problemas de contaminação deste local (WHITE & CLAXTON, 2004).

As propriedades dos compostos definem sua distribuição e estabilidade no ambiente. Assim, compostos orgânicos e inorgânicos persistentes e insolúveis são virtualmente imobilizados no solo, permanecendo no local por anos ou mesmo se bioacumulando

(WINEGARDNER, 1995; DRAGUN, 1998). Já a dispersão de efluentes no solo pode gerar tanto contaminação direta deste compartimento ambiental como indireta, através da liberação de poluentes para o lençol freático e para os vegetais (MONARCA et al., 2002; ALEEM & MALIK, 2003).

Entre os principais compostos inorgânicos presentes nos efluentes industriais estão os metais pesados que, devido a sua toxicidade e capacidade de acumulação são de grande significado ecológico. Suas características tóxicas dependem das concentrações e espécies químicas que estão presentes no ambiente (SCHNOOR, 1996). Em suas formas catiônicas e quando ligados a cadeias curtas de carbono, os metais pesados representam maior risco. Os íons metálicos formam complexos com grande quantidade de ligantes e exercem influência sobre várias funções biológicas (MAGALHÃES, 2005).

A mobilidade e disponibilidade dos metais dependem do gradiente de oxigênio, potencial redox, pH e temperatura do solo. Ao contrário da maioria dos poluentes, estes não são biodegradáveis, tendo efeitos de longa duração devido à forte adsorção de muitos metais nos colóides húmicos e de argila (IWEGBUE et al., 2009). Alguns metais como arsênio, cádmio, chumbo, cromo e níquel possuem efeito mutagênico e/ou clastogênico (TSALEV & ZAPRIANOV, 1993; WHITE & CLAXTON, 2004). O efeito de bioacumulação apresentado por alguns metais reforça a necessidade de monitorar sua presença no ambiente, bem como sua possível biodisponibilidade, através de avaliações físicas e químicas, testes de toxicidade e genotoxicidade (LEMOS et al., 2009; KOUBA et al., 2010; NAGAJYOTI et al., 2010).

1.5 Acúmulo de metais em vegetais

A utilização de efluentes industriais para irrigação do solo pode ser recomendada como uma forma de aumentar o aporte de água para a região, além de proporcionar o

acréscimo de macro e micronutrientes para a biota terrestre, aumentando assim a porcentagem de matéria orgânica disponível aos vegetais. Entretanto é necessário um monitoramento constante para avaliar as alterações nas propriedades do solo, pois este incremento pode se tornar maior do que o potencial de transformação e assimilação, provocando a bioacumulação principalmente de substância persistentes como os metais pesados.

Os vegetais podem ser utilizados em áreas de contaminação de solo como ferramentas de biorremediação, porém a destinação final destes precisa ser adequada, pois a absorção pelas plantas de compostos tóxicos, genotóxicos e/ou carcinogênicos, entre estes os metais pesados, aumenta o risco destas substâncias entrarem na cadeia trófica (FERREIRA et al., 2003).

1.6 Ensaio de ecotoxicidade

A ecotoxicidade dos efluentes refere-se à capacidade das substâncias que o compõe de causar impacto nos organismos ao serem lançadas no corpo receptor. Tais impactos podem ser alterações de comportamento, crescimento, reprodução e mesmo a morte. O objetivo dos ensaios de ecotoxicidade é simular os efeitos produzidos no ambiente após o lançamento do efluente. Uma bateria de testes de ecotoxicidade, em uma análise completa, geralmente, prevê a utilização de organismos de no mínimo três níveis tróficos para que possam ser capazes de representar as funções de produtor, consumidor e decompositor em um ambiente natural (RIO GRANDE DO SUL, 2006b). Os bioensaios para avaliar ecotoxicidade aguda e crônica têm sido amplamente utilizados como ferramenta de análise do impacto ambiental causado pela dispersão de efluentes, avaliando de forma ampla os efeitos de misturas complexas na biota.

Os bioensaios são utilizados de maneira mais eficiente para avaliar a biodisponibilidade de compostos químicos, pois alguns estressores ambientais somente são

detectados quando presentes em altas dosagens (LEMOS & TERRA, 2003; TERRA et al., 2009). Entretanto, em menores concentrações podem ter um efeito silencioso no código genético do indivíduo, interferir nas suas funções fisiológicas e modificar a frequência reprodutiva, a qualidade e a quantidade dos organismos gerados (TERRA & FEIDEN, 2003; TERRA et al., 2009). A associação de ensaios que medem genotoxicidade e mutagenicidade pode, assim, esclarecer os efeitos observados em presença de baixas dosagens de estressores ambientais.

1.7 Ensaios que medem mutagênese ambiental

Mutagenicidade são alterações do DNA causadas por agentes físicos, químicos e biológicos que interagem com esta molécula. Caso os erros no código genético não possam ser reparados pelos mecanismos celulares existentes, a lesão se mantém e se estabelece uma mutação. O aparecimento de mutações pode ocorrer durante todo o ciclo vital dos seres vivos sendo fundamental para a evolução e diversidade das espécies. Muitas das mutações passam despercebidas, por alterar muito pouco o metabolismo celular, enquanto outras podem causar a morte celular ou um crescimento desordenado de células. A regulação de agentes mutagênicos ambientais é necessária, uma vez que o evento mutagênico é um prognóstico razoável para carcinogenicidade. A detecção de danos genotóxicos se constitui, portanto, num alerta quanto à manutenção do equilíbrio ambiental e da saúde humana (RIBEIRO & MARQUES, 2003).

Ensaios de curta duração têm sido frequentemente utilizados para a triagem do risco potencial de genotoxicidade para essas misturas complexas (DEMARINI et al., 1991; VARGAS et al., 1993; CLAXTON et al., 1998). Tanto os testes que medem toxicidade quanto mutagênese são capazes de detectar substâncias que mesmo em baixas concentrações

podem ser acumuladas pelos organismos, acarretando prejuízos genéticos e fisiológicos (JUVONEN et al., 2000; VARGAS et al., 2001; FERNÁNDEZ et al., 2005).

Em revisão de literatura sobre mutagenese em solo contaminado White e Claxton (2004) descreveram a utilização do ensaio *Salmonella*/microsossoma ou Teste de Ames para avaliar o potencial de mutagenicidade de amostras de solo sujeitas a diferentes tipos de contaminação antrópica. Este teste tem sido a metodologia mais utilizada para detectar substâncias com potencial genotóxico, sendo empregado em laboratórios de vários países de forma padronizada (WHITE & CLAXTON, 2004; OHE et al., 2004). Os protocolos iniciais e as primeiras tentativas de padronização desse ensaio datam da década de 1970. Os primeiros estudos utilizando este teste buscavam associar os resultados à carcinogenicidade potencial de compostos mutagênicos (AMES et al., 1975; MORTELMANS & ZEIGER, 2000). Atualmente é parte das baterias de testes *in vitro* para prever efeito carcinogênico de substâncias químicas (KIRKLAND et al., 2005). A partir dos anos 90, o ensaio tem sido empregado para fins de avaliação ambiental, particularmente para análises de misturas complexas em amostras de água, ar, sedimento e solo, como evidenciado nas revisões da literatura (OHE et al., 2004; CLAXTON et al., 1998; WHITE & CLAXTON, 2004; CHEN & WHITE, 2004) bem como destacados nos estudos do Rio Grande do Sul/Brasil (VARGAS et al., 1993; 1995; 2003; TAGLIARI et al., 2004; SILVA JÚNIOR et al., 2009; LEMOS et al., 2009; PEREIRA et al., 2010; POHREN et al., 2012).

No ensaio *Salmonella*/microsossoma, as especificidades das linhagens definem os tipos de mutação que são induzidas por agentes genotóxicos. Existem bancos de dados disponíveis contendo resultados deste ensaio para uma grande variedade de compostos químicos, medicamentos e misturas complexas. Várias linhagens, com sensibilidade específica a determinadas classes de substâncias, têm sido selecionadas. Associando linhagens sensíveis, constante aprimoramento nos protocolos e diferentes condições de metabolização, tem sido

possível identificar compostos potencialmente cancerígenos de maneira mais específica (UMBUZEIRO & VARGAS, 2003).

White e Claxton (2004) ressaltaram a utilização de mais de 30 testes diferentes para avaliar a presença de substâncias que conferem mutagênese, genotoxicidade, ou carcinogênese em amostras de solo. Ao realizar esta revisão, constataram que os ensaios mais frequentemente utilizados incluem cepas específicas de microrganismos, tais como, o teste de mutagenicidade com *Salmonella* e outros procariontes (50,8%) os testes em plantas, como o de aberração cromossômica em *Allium cepa* e do micronúcleo com *Tradescantia* (37,6%), testes com organismos eucarióticos *in vitro* (6,1%) além de outros testes (5,5%).

A aplicabilidade do teste *Salmonella*/microsoma para avaliar o potencial mutagênico de resíduos e efluentes industriais é similar a de solos. Já Houk (1992) em revisão da literatura, indicava a utilização deste ensaio em 50,8% dos estudos publicados. Entre as avaliações restantes 37,6% do total empregava testes de genotoxicidade com plantas *Allium sp.* e *Tradescantia sp.*, além de ensaios para efeitos citogenéticos em linfócitos humanos cultivados, mutações de células somáticas em *Drosophila*, entre outros (11,6%). Este histórico justifica a inclusão do teste *Salmonella*/microsoma para analisar o potencial mutagênico no presente estudo tanto para amostras de efluentes industriais como de solo.

1.8 Legislações ambientais que regulamentam a dispersão de efluentes

As políticas ambientais estão defasadas na fixação de limites para o lançamento de substâncias no solo que possam vir a comprometer o equilíbrio do ecossistema. Assim, analisando as legislações que visam fixar parâmetros no Brasil, como por exemplo, a conservação da água através das Resoluções CONAMA nº20 (BRASIL, 1986) e nº 357 (BRASIL, 2005) e do ar, Resolução CONAMA nº 3 (BRASIL, 1990) são muito anteriores à

legislação de conservação do solo, Resolução CONAMA nº 420 (BRASIL, 2009). Além disso, a legislação referente à Qualidade do Solo, não contempla critérios de referência para respostas de toxicidade ou genotoxicidade.

Vários estudos nacionais e internacionais (FEPAM, CETESB, ISO, USEPA, APHA) recomendam o uso do teste *Salmonella*/microsoma nas suas diferentes versões metodológicas, como método adequado para avaliar a qualidade do ar, água e solo. As vantagens deste teste são de que a maioria das linhagens bacterianas utilizadas apresenta características que as tornam mais sensíveis para a detecção de mutações. Entre estas a presença de seqüências sítio-específicas no DNA, que respondem positivamente para a reversão, aumento da permeabilidade celular para grandes moléculas, ausência do sistema de reparo de DNA livre de erro e plasmídios contendo genes que causam aumento do processo de reparo sujeito a erro (VARGAS et al., 2001).

No Brasil, Rio Grande do Sul, São Paulo, Santa Catarina, Paraná e Minas Gerais possuem regulamentações que merecem destaque, pois suas resoluções preveem a aplicação dos conceitos de avaliação ecotoxicológica como um dos critérios determinantes da regulamentação da dispersão de um efluente industrial nos recursos hídricos.

No estado de São Paulo, o monitoramento ambiental fica a cargo da CETESB, Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Nesta instituição o controle ecotoxicológico de efluentes líquidos foi implantado nos anos 90 através da Resolução SMA-Secretaria de Meio Ambiente 03 (SÃO PAULO, 2000).

No estado de Santa Catarina, o emprego de análises ecotoxicológicas teve início em 1997, através da Fundação de Meio Ambiente do Estado de Santa Catarina/FATMA, através de uma Portaria que estabelece o limite máximo de toxicidade aguda para efluentes de diferentes origens, e resolve que as substâncias existentes em um efluente não poderão causar ou possuir potencial causador de efeitos tóxicos capazes de provocar alterações no

comportamento e fisiologia dos organismos aquáticos presentes no corpo receptor e descreve a necessidade de utilização de testes ecotoxicológicos padronizados para expressar a toxicidade de um efluente (SANTA CATARINA, 2002).

No Paraná, foi introduzida a Resolução nº 081 (PARANÁ, 2010) que dispõe sobre os critérios, padrões dos ensaios ecotoxicológicos e monitoramento ambiental que são promovidos pelo Instituto Ambiental do Paraná (IAP). Estes ensaios são utilizados para o automonitoramento industrial, que estabelece a utilização dos ensaios biológicos para o monitoramento da qualidade das águas superficiais, avaliação integrada da qualidade da água; como também no monitoramento de acidentes ambientais.

Em Minas Gerais, a Deliberação Normativa Conjunta nº01 (MINAS GERAIS, 2008) dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes. Recomenda o emprego de métodos biológicos para a avaliação de toxicidade de efluentes devendo ser utilizados ensaios ecotoxicológicos já padronizados e indicados pelo órgão ambiental competente para assegurar o correto lançamento de efluentes nas coleções hídricas do estado.

A avaliação ecotoxicológica de efluentes industriais no estado do Rio Grande do Sul é regulamentada pela FEPAM. Através da Resolução CONSEMA nº. 128 (RIO GRANDE DO SUL, 2006a) que dispõe sobre a fixação de padrões de emissão de efluentes líquidos para fontes industriais ou domésticas que lancem seus efluentes em águas superficiais no Estado do Rio Grande do Sul. Esta resolução inclui os testes ecotoxicológicos como métodos de detecção de novas formas de poluição e da ação cumulativa de poluentes nos ecossistemas.

Já a Resolução CONSEMA nº. 129 (RIO GRANDE DO SUL, 2006b), dispõe sobre a definição de critérios e padrões de emissão para toxicidade de efluentes líquidos, industriais e domésticos, lançados em águas superficiais do Estado do Rio Grande do Sul. Embasada em

estudos desenvolvidos na FEPAM em recursos hídricos (FEPAM, 2008) apresenta uma forma gradual e escalonada de aplicar as avaliações de ecotoxicidade, respeitando a vazão do efluente, definindo metas e prazos para as empresas se adequarem aos níveis de toxicidade do efluente, incluindo a genotoxicidade, através de análise para mutagenicidade utilizando o teste *Salmonella*/microsoma. Busca decrescer os níveis de efeito tóxico e genotóxico do efluente, aplicando o princípio da precaução e procurando restringir o risco de liberação de substâncias perigosas nas águas superficiais do estado.

O emprego de testes que avaliam toxicidade aguda e crônica para controle de efluentes industriais é amplamente empregado para avaliação do lançamento em recursos hídricos com normas padronizadas pela USEPA, pela APHA, pelo *Environment Canada* e no Brasil pela ABNT. No entanto, internacionalmente a regulamentação de métodos biológicos para a avaliação de toxicidade de um efluente não é muito clara. Ocorrem variações de acordo com a localização e com o grau de amadurecimento das políticas públicas em que se encontrem cada país para com a questão ambiental.

O uso de testes com organismos vivos é amplamente utilizado em países da Europa, Canadá e nos Estados Unidos, tendo por base a legislação ambiental. Na Alemanha, por exemplo, a regulamentação do lançamento de efluentes industriais e sanitários é definida na WHG (*Gesetz zur Ordnung des Wasserhaushalts*), a Lei Federal sobre a Água e detalhada na Lei das Taxas sobre Efluentes Líquidos, (DELGADO, 2006) a qual segue a Regulamentação Geral Administrativa para os efluentes de diferentes ramos industriais. Esta regulamenta tanto efluentes com descarga direta no corpo receptor, quanto efluentes com descarga indireta na rede coletora de esgotos. Neste último caso, o efluente é direcionado para uma ETE municipal para tratamento em conjunto com o esgoto doméstico (SÄAR, 2005). No Canadá existe o *Wastewater Systems Effluent Regulations* publicada em 18 de julho de 2012 (RUBINGER, 2009) regulamentado pelo Environment Canada que propõe a avaliação de efluentes através

de testes de toxicidade aguda. Nos EUA existe a *National Policy Regarding Whole Effluent Toxicity Enforcement* de 04 de agosto de 1995 regulamentada pela *U.S. Environmental Protection*. Desde 2004, encontra-se em consulta pública uma revisão desta legislação: *National Whole Effluent Toxicity (WET) Implementation Guidance Under the NPDES Program* desde 2004 (USEPA, 2005). Esta recomenda o biomonitoramento destinado a avaliar o impacto efetivo ou potencial que o despejo de efluentes possa causar à vida aquática, utilizando métodos biológicos. Deste modo os pressupostos de biomonitoramento podem vir a ser definidos através de uma avaliação da toxicidade de um efluente por testes toxicológicos ou do impacto de um efluente através da investigação das comunidades de entorno aos pontos de lançamentos.

1.9 Histórico nacional das análises quanto a disposição de efluente no solo

No Brasil, tradicionalmente os estudos de dispersão de água de reuso, lançamento de resíduos de ETE (Estações de Tratamento de Esgoto) ou efluentes industriais no solo, geralmente, focalizam análises das concentrações de matéria orgânica, metais pesados, DBO (demanda bioquímica de oxigênio), além dos micro e macronutrientes que podem alterar os padrões físicos e químicos do solo. A literatura mostra ainda que estudos no Brasil têm monitorado esta liberação por análises de parâmetro físicos e químicos do solo e acumulação de metais em plantas após a irrigação destes com efluentes (BERTON et al., 2006; SANDRI et al., 2009; BARRETO et al., 2013; CABRAL et al., 2011).

Análises que agregam dados físico-químicos, de toxicidade e genotoxicidade são descritos por Ferraz et al. (2010) que avaliam a dispersão de efluentes ricos em corantes que são dispersos em recursos hídricos. Umbuzeiro et al. (2005) e Oliveira et al. (2007) realizaram análises de efluentes de indústria têxtil lançados em recursos hídricos no estado de

São Paulo através de análises para mutagenicidade. No Rio Grande do Sul, estudos realizados por VARGAS et al., 1993; VARGAS et al. 2001, VARGAS et al., 2008, LEMOS et al., 2009, avaliaram a influencia de resíduos industriais, urbanos e da agricultura na água de rios especialmente nas bacias hidrográficas dos rios Caí e dos Sinos.

Análises de toxicidade associados a parâmetros físico-químicos do solo foram descritos por Fernández et al. (2005) em que caracteriza solos contaminados utilizando como ferramentas análises químicas e biológicas; Leme et al. (2012) avaliaram a contaminação do solo por biodiesel; Niemeyer et al. (2012) estudaram o solo contaminado com rejeitos de indústria de fundição de metais em Santo Amaro no estado da Bahia. Outros trabalhos associam análises físico-químicas e mutagênicas do solo e dentre eles podemos citar no Rio Grande do Sul, Silva Júnior & Vargas (2009) que investigaram solo contaminado por rejeitos de carvão; Pohren et al. (2012) que avaliaram o solo de uma indústria desativada de conservantes de madeira.

O estudo realizado por Terra et al, 2009, avaliou o impacto ambiental do efluente de indústria petroquímica disposto no solo, através de análises físicas e químicas do efluente e do solo, testes de toxicidade com crustáceos (*Daphnia magna*) e estudos de mutagenicidade através do ensaio *Salmonella/microsoma* e identificaram que a toxicidade crônica com *D. magna* e a mutagenicidade elevada no período de inverno foram os achados mais significativos.

O presente estudo avaliou se o efluente final tratado de empresa metal mecânica, utilizado para irrigação de área controlada e o solo receptor deste efluente apresentou compostos com ação tóxica e/ou mutagênica formando misturas complexas sujeitas a alterações na interação efluente - solo receptor. Contribuindo com subsídios para regulamentação da disposição de efluentes no solo. Complementando os objetivos do estudo foram avaliados o acúmulo de contaminantes nas raízes e folhas de *Lolium multiflorum* e nas

folhas de *Eucalyptus grandis* como receptores ecológicos sentinelas deste impacto e sua capacidade de contribuir para a biorremediação do local.

1.10 Informações preliminares relevantes sobre a área de estudo

Como primeira etapa de trabalho, foi realizada visita ao local de estudo para conhecer as instalações e os processos de produção, armazenamento e destinação dos resíduos sólidos da Empresa do ramo metal mecânico, situada na região noroeste do estado do Rio Grande do Sul, além do controle e tratamento dos efluentes produzidos pela indústria. A área de aspersão do efluente também foi observada, para o acompanhamento das condições físicas detectáveis visualmente no solo e nos vegetais plantados no local.

Foram ainda examinados dados institucionais do licenciamento industrial, mais especificamente sobre o processo de produção, caracterização química do efluente, histórico de uso do solo, testes de toxicidade preliminares e informações prévias sobre a licença ambiental de aspersão do efluente tratado no solo (Processo FEPAM nº 0366/2011). Os dados que fazem parte deste processo serão utilizados como referência nas análises e discussões desta dissertação. Nos anexos de A a L, estão descritos de forma mais detalhada, um histórico das análises físico-químicas do efluente durante o ano de 2011, análise quantitativa de agrotóxicos residuais no solo e resultados de ensaios de ecotoxicidade.

2 ARTIGO CIENTÍFICO: Potencial tóxico e mutagênico de efluente de indústria metal mecânica disposto no solo

O presente trabalho resultou na preparação de um artigo científico que relata a investigação de contaminantes tóxicos e mutagênicos presentes no efluente de uma indústria do ramo metal mecânico e a possível contaminação do solo resultante da aspersão deste efluente, utilizando análises químicas, ensaios de ecotoxicidade aguda e crônica, biomarcadores de genotoxicidade, além da análise de bioacumulação de contaminantes em vegetais: Potencial tóxico e mutagênico de efluentes tratados de uma indústria metal mecânica dispostos no solo.

POTENCIAL TÓXICO E MUTAGÊNICO DE EFLUENTE DE INDÚSTRIA METAL MECÂNICA DISPOSTO NO SOLO

**Daniele Gervazoni Viana das Neves^{a,b,c}, Jocelita Aparecida Vaz Rocha^a e Vera Maria
Ferrão Vargas^{a,b*}**

RESUMO

O destino final dos efluentes industriais são uma constante preocupação para os órgãos de defesa ambiental, pois as substâncias presentes nestas mistur Para diagnosticar possíveis danos ambientais causados pela aspersão do efluente no solo foram realizados testes físicos e químicos, ensaios de avaliação ecotoxicológica e mutagênica tanto no efluente quanto no compartimento ambiental que o recebe – o solo, além de análises de acumulação de metais nos vegetais da área como receptores ecológicos. A maioria dos parâmetros físicos e químicos esteve dentro dos padrões legais para efluentes, com exceção dos níveis de N e P totais e Ni para solo. Valores mais elevados no solo irrigado (SI) em relação ao de referência (SR) foram observados para P, K e a maioria dos metais analisados. A caracterização de metais nos vegetais mostrou concentrações maiores em SI em relação ao SR. As raízes de *Lolium multiflorum* apresentaram valores mais elevados do que os observados em folhas, principalmente em relação a Al, Fe, Ni, Zn, Cu, Cr e Pb. A toxicidade do efluente indicou presença de efeito agudo e crônico para *C. dubia* e crônico para *Pseudokirchneriella subcaptata*. Testes de sobrevivência e crescimento em *Oryza sativa*, *Raphanus sativus* e *Lactuca sativa* (plântulas) e *Eisenia fetida* (minhoca) apresentaram decréscimo de crescimento para *O. sativa* e *E. fetida*; já no teste de ciclo de carbono e nitrogênio para microrganismos do solo a toxicidade foi ausente. O teste de fuga em SI com *E. andrei* mostrou resposta negativa. A mutagênese do efluente e de solo foi avaliada no ensaio *Salmonella*/microssoma, método de microssuspensão, na presença e na ausência de metabolização (S9). As linhagens utilizadas foram TA98, TA97a, TA100, TA102 e YG1041 e 1042 –S9(sensível a nitrocompostos) no DNA. O efluente mostrou respostas significativas (programa SALANAL), com valores (revertentes/ml) de 510±151,8 (TA97a -S9) e 780±136,9 (TA100+S9) e citotoxicidade. Para extratos orgânicos, os resultados foram indicativos (TA97a+S9). A mutagênese dos extratos ácidos do solo foi positiva (92±31,7 revertentes/mg de solo seco equivalente) para TA97a+S9 e indicativa para TA100+S9. Os efeitos indicam que compostos inorgânicos, como metais pesados, podem levar à toxicidade e mutagênese observada, além de acumularem nos vegetais. Os estudos subsidiam medidas preventivas para legislação que contemple restrições ao lançamento de substâncias potencialmente poluidoras no solo.

^aPrograma de Pesquisas Ambientais, Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luís Roessler (FEPAM), Avenida Salvador França, 1707 CEP: 90690-000 Porto Alegre, RS, Brasil.

^bPrograma de Pós-graduação em Ecologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9500, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil.

^cInstituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia Sul-Rio-Grandense – Campus Sapucaia do Sul (IF Sul-Rio-Grandense), Av. Copacabana, 100, CEP 93216-120, Sapucaia do Sul, RS, Brasil.

*Programa de Pesquisas Ambientais, Divisão de Biologia, Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luís Roessler (FEPAM), Avenida Salvador França, 1707 CEP: 90690-000, Porto Alegre, RS, Brasil. Tel.: +55 51 33346765; fax: +55 51 33346765. ecorisco@fepam.rs.gov.br

Palavras-chave: efluente industrial, solo, análise físico-química, efeito agudo e crônico, mutagenicidade.

1 INTRODUÇÃO

A contaminação do meio ambiente devido ao lançamento de compostos químicos não removidos no processo de tratamento de efluentes representa um fator de risco a ser considerado pelo setor industrial. Quanto maior a carga de substâncias potencialmente tóxicas no efluente gerado, mais complexo e de longa duração poderá ser o seu processo de tratamento, visando que, ao ser liberado no meio ambiente, não cause contaminação/poluição nos corpos hídricos e no solo.

Os efluentes líquidos contem misturas de substâncias que podem agir de forma combinada, através de interações aditivas, sinérgicas ou antagônicas, tornando complexa a avaliação dos riscos gerados pela sua disposição no ambiente. Testes físicos e químicos, apesar de essenciais não são capazes de fornecer informações sobre as interações entre estas substâncias e as que estão presentes no meio, bem como as consequências para a biota (CLAXTON et al., 1998; FERNÁNDEZ et al., 2005).

Bioensaios avaliam mudanças tanto na mobilidade, na fisiologia, na reprodução e no número do organismo teste, refletindo a presença de poluentes, permitindo inferir o diagnóstico de qualidade do ambiente. Apontam situações de estresse do ecossistema que podem comprometer a sua estrutura e funcionalidade, além de afetar a biodiversidade e refletir a possível ocorrência de danos à saúde humana (OHE et al., 2004; FEPAM, 2008).

Tradicionalmente o lançamento dos efluentes industriais e domésticos ocorre em recursos hídricos, geralmente, buscando sua capacidade em diluir e transportar as substâncias. Com esta prática, através dos anos, tem sido possível observar o decréscimo da qualidade das

águas superficiais, levando em alguns casos a processos de poluição e eutrofização que causam a mortandade de espécies aquáticas do local. Apesar da existência de legislação específica para o lançamento de efluentes em ambiente aquático no Brasil (BRASIL, 2011), CONAMA 430, complementando legislações estaduais, como no Rio Grande do Sul, CONSEMA 128 e CONSEMA 129, (RIO GRANDE DO SUL, 2006a,b) a poluição por substâncias tóxicas provenientes de efluentes domésticos e indústrias continua a ocorrer, sendo estes as principais fontes responsáveis por sua contaminação (FEPAM, 2008).

Nova abordagem de dispersão de efluentes tem surgido como alternativa para as indústrias. Esta propõe o lançamento de efluentes tratados no solo, ponderando que este compartimento ambiental funcionaria como um filtro e proporcionaria o incremento de água em locais onde o índice pluviométrico fosse considerado baixo, além de fornecer nutrientes para vegetação (KANSAL, 1994).

Uma avaliação minuciosa para definir os riscos ecológicos da implementação destes empreendimentos se torna necessária. Historicamente sabe-se que tanto a atividade agrícola quanto a industrial se constitui nas principais fontes de contaminação do ambiente terrestre, pois fazem uso de substâncias químicas potencialmente tóxicas que entram no ecossistema edáfico por aplicação direta ou por descarte. Assim, substâncias como os agrotóxicos oriundos da agricultura, metais pesados, ou mesmo outros compostos orgânicos perigosos, presentes no efluente industrial se depositam no solo onde podem ser absorvidos e até bioconcentrados pelos organismos ali presentes (ANSARI & MALIK, 2009).

A produção diária de uma indústria metal mecânica gera uma série de resíduos, como metais pesados, que constituem constante preocupação ambiental. Apesar das pesquisas e investimentos no tratamento destas substâncias, muitas delas se mantêm nos efluentes que são dispersos no ambiente. Este segmento industrial caracteriza-se pelo uso de uma diversidade de insumos em seus processos produtivos, como tintas, materiais metálicos e solventes, o que

umenta o risco de contaminação caso o tratamento empregado ao efluente não seja eficaz para garantir a remoção dos compostos químicos tóxicos.

A avaliação ecotoxicológica de um determinado ambiente passa pelo conhecimento das fontes de emissão dos poluentes, suas transformações, biodisponibilidade, difusões e destinos finais (ZAGATTO, 2006; ANSARI & MALIK, 2009; NIEMEYER et al., 2012). Os bioensaios contribuem para estes estudos e têm sido aplicados internacionalmente na rotina de órgãos ambientais, no âmbito do licenciamento e da fiscalização de atividades potencialmente causadoras de poluição, bem como do monitoramento da qualidade das águas. Estão sendo preferentemente aplicados em ações preventivas, ou seja, para estimar riscos futuros devido à liberação de substâncias perigosas no meio ambiente e não apenas para avaliar danos já ocorridos (KNIE & LOPES, 2004; FEPAM, 2008).

No Brasil, algumas regulamentações estaduais merecem destaque como as resoluções dos estados do Rio Grande do Sul, São Paulo, Santa Catarina, Paraná e Minas Gerais que aplicam os conceitos de avaliação ecotoxicológica como um dos critérios determinantes da regularização da dispersão de um efluente industrial e, em alguns casos, também domésticos, antes de seu lançamento nos recursos hídricos. É importante destacar que a legislação do estado do Rio Grande do Sul inclui a genotoxicidade como um nível de avaliação regulamentado, CONSEMA 129 (RIO GRANDE DO SUL, 2006b).

Os objetivos do presente estudo buscaram informações através de análises químicas, ecotoxicológicas e genotóxicas, além da acumulação de contaminantes em vegetais, para avaliar de forma preventiva os possíveis danos ambientais causados por aspersão de efluentes no solo. Estes resultados visaram fornecer subsídios para regulamentação dessa disposição, partindo de modelos já conhecidos como as legislações vigentes para recursos hídricos, acrescentando a elas outros testes ecogenotoxicológicos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Área de estudo

A área de estudo está localizada no estado Rio Grande do Sul, situado ao sul do Brasil a uma distância de 290 km da capital Porto Alegre (Figura 1). Focaliza o efluente final tratado de empresa metal mecânica, além do solo situado em área vizinha ao complexo industrial na empresa onde tem sido realizada a aspersão do efluente. A empresa possui um terreno total de 233.000 m², destes 65.000 m² de área construída. A área de aspersão do efluente possui 12 hectares e é destinada ao cultivo de eucaliptos e gramíneas. Deste total, em cinco hectares e meio, realiza-se o processo de irrigação por aspersão do efluente tratado, compreendendo a área florestal de *Eucaliptus grandis* (2000 mudas a serem destinadas para cortes de lenha) e área de gramíneas (*Lolium multiflorum*) para forragem evitando a erosão do solo. Estes vegetais não se destinam ao consumo como pasto de animais. Próximo existe uma área residencial de pequeno porte.

De acordo com informações obtidas no Processo FEPAM nº 0366/2011 (FEPAM, 2011), as águas subterrâneas não recebem a influência do efluente aspergido no solo, pois o manancial é profundo e protegido por solo argiloso.

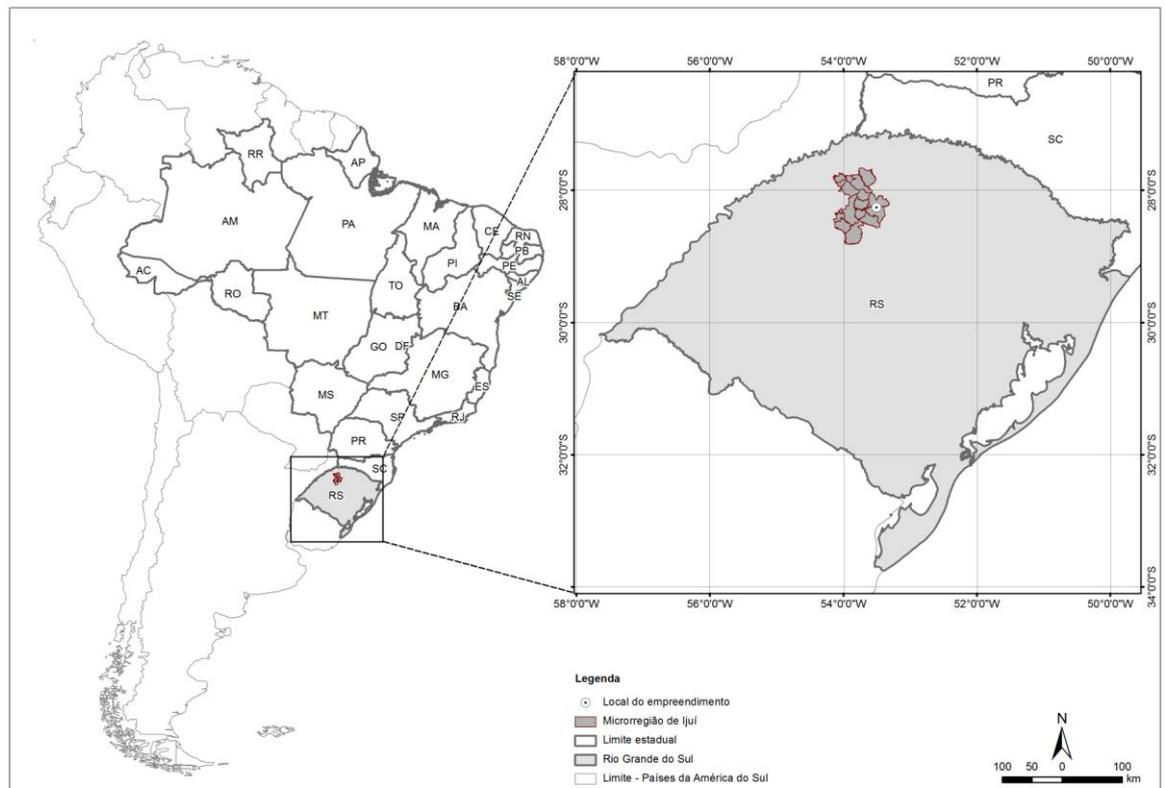


Figura 1 - Localização da área de estudo

2.2 Efluente industrial

O parque industrial avaliado apresentou entre seus insumos compostos inorgânicos, como metais pesados e orgânicos, como solventes, tintas, óleos lubrificantes, entre outros,

podendo gerar potencialmente, resíduos metálicos e orgânicos. Foi prevista na estação de tratamento, uma vazão diária de efluentes líquidos de cerca de 600 m³, sendo assim a empresa foi considerada para o estado como de médio porte (RIO GRANDE DO SUL, 2006b). Estes resíduos após serem associados ao esgotamento sanitário e submetidos a tratamento prévio, passaram para o processo de aspersão no solo.

O início da disposição de efluentes no solo ocorreu em janeiro de 2011, amparado pela legislação estadual (RIO GRANDE DO SUL, 2006a), uma vez que o efluente final tratado atendia aos parâmetros físicos e químicos exigidos. Porém, o efluente apresentava padrões de toxicidade com inibição de crescimento (FT=32) para algas (*Pseudokirchneriella subcaptata*) nas análises preliminares.

2.3 Caracterização do solo

O solo da área de estudo resultou da decomposição de basaltos sub-adjacentes predominando os latossolos ao longo de toda a área destinada a abrigar a aspersão dos efluentes. Constituem-se, portanto de solos basicamente argilosos. Nessa área, de acordo com as análises granulométricas do Centro de Estudos de Geologia Costeira e Oceânica da UFRGS, o solo possui em sua composição básica 49,59% de teores de argila, 11,23% de areia e 39,17% de grânulos silteosos, sendo a classificação textual (Shepard) de lama, com coeficientes de infiltração na média de 82,64 l/m²/dia.

2.4 Delineamento amostral

2.4.1 Coleta de amostras de efluente tratado

A amostragem foi realizada de acordo com *American Public Health Association* (APHA, 2005). O efluente foi coletado no tanque de armazenagem antes de sua aspersão no solo em uma profundidade de 2 metros. A amostragem foi realizada no dia 08 de setembro de 2011 e as amostras transportadas refrigeradas e estocadas sob-refrigeração até a realização dos ensaios. Na Tabela 1 estão especificados as quantidades amostradas e os diferentes ensaios realizados.

Tabela 1- Amostragem e ensaios realizados com o material.

Amostra	Volume (ml) Peso (Kg)	Testes	Normatização
Efluente	5000 ml	Ecotoxicidade aguda e crônica em três níveis tróficos	ABNT NBR 15469/2007; ABNT NBR 13373/2005; ABNT NBR 12648/2005
	500 ml	Quantificação dos 16 HPAs prioritários pela USEPA (CWA, 2007)	NBR ISO/IEC 17025/2005
	500 ml	Análise qualitativa de orgânicos voláteis	NBR ISO/IEC 17025/2005
	500 ml	Quantificação de metais	POP PA 037/USEPA 245.7; POPPA 035/SMWW3120B; USEPA 6010C
	500 ml	Análise de mutagênese	Ensaio <i>Salmonella</i> /microsoma Teste de Ames Clássico); ISO16240/2005)
	2000 ml	Análise de Mutagênese em extratos orgânicos	Ensaio <i>Salmonella</i> /microsoma (Teste de Kado)
Solo	300 g	Análise granulométrica	Classificação por frequência simples e textual (Shepard)
	400 g	Análise de Mutagênese nos extratos ácido e orgânico	Ensaio <i>Salmonella</i> /microsoma Teste de Kado)
	50 g	Quantificação de metais	USEPA 7471 A; USEPA 3050/ICP-OES
	30 g	Quantificação de HPAs prioritários pela USEPA (CWA, 2007)	USEPA 3550C e 8270D
	1500 g	Toxicidade sub-letal/ Fuga de <i>Eisenia Andrei</i>	ISO 17512-1/2008
Vegetais	600 g de folhas e 200 g de raízes	Análise quantitativa de metais	USEPA 6010; USEPA 245.7; USEPA 22nd 2012(SMWW)

2.4.2 Pontos de amostragem de solo

Para amostragem de solo as áreas de aspersão foram subdivididas em ÁREA 01, ÁREA02, ÁREA03 e ÁREA04 de acordo com o calibre dos dutos de aspersão. Estes foram colocados respeitando o relevo do local para que todas as áreas recebam volumes similares de efluente de acordo com a capacidade de escoamento e absorção das mesmas (Figura 2). Nas áreas mais altas foram colocados dutos de calibre maior (5,0 mm x 2,5 mm) recebendo quantidade maior de líquido para aspersão. As áreas com inclinação intermediária receberam dutos com calibres menores (4,5 mm x 2,5 mm e 4,0 mm x 2,5 mm). A última dessas áreas com menor inclinação, por receber além do efluente aspergido, o escoamento das áreas mais altas, tendo aspersão em dutos de menor calibre (3,5 mm x 2,5 mm). O local de referência, área próxima da região de aspersão do efluente, foi selecionado em uma área mais elevada recoberta com gramíneas da espécie (*Lolium multiflorum*). Nos diferentes pontos foram coletadas três sub-amostras escolhidas de forma aleatória e conduzidas ao laboratório sob refrigeração. Estas sub-amostras foram misturadas no laboratório para formar uma amostra composta de solo irrigado (SI) e outra de solo referência (SR).

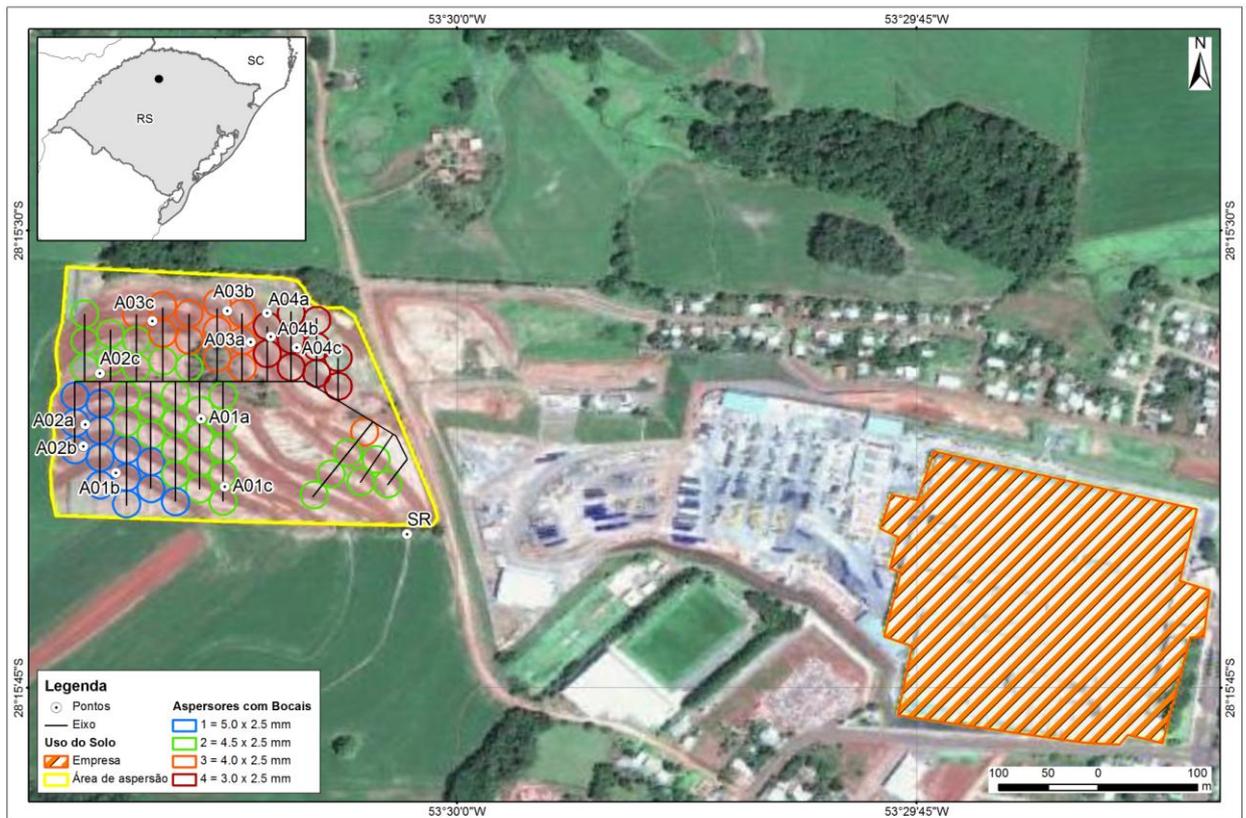


Figura 2 - Pontos de amostragem de solo nos locais que recebem aspersão do efluente (A01, A02, A03 e A04) e no local PO a área de referência

Os pontos de coleta foram demarcados de acordo com as coordenadas do DATUM WGS 1984 (Tabela 2).

Tabela 2 - Coordenadas geográficas dos pontos amostrais de coleta de solo de referência (SR), as quatro áreas do solo irrigado (SI), associados aos vegetais.

Pontos de amostragem	Coordenadas geográficas
SR	SR (S28°15'39.96'' w 53°30'1.62'')
SM Área 01 de aspersão calibre do duto (5,0 x 2,5mm)	A01a (S28°15'36.18'' W 53°30'8.34'') A01b (S28°15'37.95'' W 53°30'11.12'') A01c (S28°15'38.40'' W 53°30'7.56'')
SM Área 02 de aspersão calibre do duto (4,5 x 2,5mm)	A02a (S28°15'36.36'' W 53°30'12.12'') A02b (S28°15'37.08'' W 53°30'12.18'') A02c (S28°15'34.68'' W 53°30'11.64'')
SM Área 03 de aspersão calibre do duto (4,0 x 2,5mm)	A03a (S28°15'33.66'' W 53°30'6.72'') A03b (S28°15'32.64'' W 53°30'7.62'') A03c (S28°15'32.97'' W 53°30'9.92'')

SM Área 04 de aspersão calibre do duto (3,5x 2,5mm)	A04a (S28°15'32.70'' W 53°30'6.18'')
	A04b (S28°15'33.48'' W 53°30'6.06'')
	A04c (S28°15'33.84'' W 53°30'5.22'')

2.5 Procedimento de extração do efluente: Extração Líquido-líquido

A amostra de 800 mL foi inicialmente processada no pH natural por três ciclos de extração com solvente diclorometano grau pesticida (MERCK) (80 x 30 x 30 mL). Cada extração foi vigorosamente agitada por 2 minutos no frasco de separação de fases com um período de repouso (3 minutos) a cada procedimento. O solvente de extração foi recolhido a cada ciclo, reunido em um único frasco e filtrado em sulfato de sódio (super seco em estufa a 104°C/2horas). Os extratos foram concentrados em rota-vapor até um volume 10 mL. Para a extração ácida a amostra foi ajustada para pH 2 com H₂SO₄ (1:1) e os procedimentos de extração foram similares, modificando a proporção do solvente para 40 x 20 x 20 mL. O MOE (massa orgânica extraída) foi medida em balança analítica de cinco casas.

2.6 Procedimentos de extração do solo

Inicialmente foi definido o peso seco da amostra de solo. Neste processo a amostra previamente pesada foi colocada em estufa a 105 - 110° C por 24 horas, resfriada em dessecador e novamente pesada definindo por diferença o teor de umidade (EMBRAPA, 1997).

2.6.1 Extração ácida de solos: extratos inorgânicos

A obtenção dos lixiviados (ABNT - NBR 10 006, modificada) foi realizada submetendo a proporção de 1:2 g/ml de solo, onde para cada grama de solo foi utilizado 2 ml

de solvente. Para solubilizar os solos foram utilizadas soluções de ácido acético e hidróxido de sódio, modificadas para utilização do pH do solo (pH 6,3). A mistura foi agitada por 24h a 20°C em mesa agitadora e posteriormente centrifugada a 13,000xg por 15min a 4°C como descrito em Silva-júnior & Vargas (2009). Após, os extratos foram filtrados em membrana de 0,45µm, divididos em alíquotas e armazenados no escuro por até 24h para utilização no ensaio *Salmonella*/microssoma.

2.6.2 Extração orgânica de solos

Na preparação do extrato orgânico, 15g de solo foram extraídas com solvente diclorometano (200 ml/ ciclo) grau pesticida (DCM), em aparelho de ultrassom de 1800 W de potência por dois ciclos de 10 minutos. Os extratos resultantes foram filtrados em coluna cromatográfica com sulfato de sódio e celite, sendo após concentrados em rota-vapor a 40°C. A massa obtida foi avaliada em balança analítica de cinco casas, sendo os extratos armazenados protegidos da luz, a -20°C, por até 30 dias para a realização do ensaio de mutagênese. No momento do ensaio, foi realizada a troca do solvente DCM, por Dimetilsulfóxido grau espectrometria (DMSO), compatível com as células.

2.7 Quantificação de metais em extratos ácidos de solo

A quantificação de metais foi realizada nos extratos ácidos de solo por espectrometria de emissão óptica por plasma indutivamente acoplado (ICP-OES). As amostras de solo (2g de solo por amostra, SI e SR) foram extraídas por processo de digestão ácida (USEPA 3050B), com exceção do mercúrio. Para as análises de mercúrio foi realizada digestão úmida (USEPA

7471 A). Estas análises foram realizadas no Laboratório de Análises Ambientais, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil – Laboratório de Solos.

2.8 Amostragem de vegetais

Foram coletadas amostras de vegetais nas diferentes áreas de SI e no local escolhido como SR. Foram amostradas folhas verdes recém-maduras que se constituem nos órgãos da planta que melhor refletem o estado nutricional da cultura, sendo, portanto, as mais indicadas para serem amostradas. Evitou-se colher plantas que não estivessem inteiras e sadias ou atacadas por pragas e doenças EMBRAPA (2005). Foram coletadas dez folhas de eucalipto (*Eucalyptus grandis*) em SI e de gramíneas (*Lolium multiflorum*) em SI e SR, em cinco vegetais de cada espécie, por ponto de coleta. Em relação às amostras de gramíneas (*Lolium multiflorum*) foram coletadas também raízes. O material amostrado foi mantido em sacos de papel pardo e conservado em caixa de isopor até a preparação das amostras para o envio ao laboratório (FRIZZO, 2002).

As folhas foram mantidas em recipiente previamente lavado com uma solução de 40 % de HNO₃ (ácido nítrico), água da torneira, água destilada e Milli – Q. As raízes foram lavadas com água da torneira e posteriormente com água destilada para a retirada de quaisquer partículas que pudessem contaminá-las (MALAVOLTA et al., 1997; FRIZZO, 2002). Após, as amostras foram acondicionadas em sacos plásticos, para análise de metais e sacos de papel para análises de substâncias orgânicas, etiquetados e mantidos sob refrigeração até o momento da análise.

2.9 Testes de toxicidade

2.9.1 Testes de toxicidade com efluente final tratado

2.9.1.1 Ensaio de ecotoxicidade aguda e crônica

Para avaliar o efeito de ecotoxicidade aguda e crônica do efluente final tratado foram realizados testes em três níveis tróficos:

Ensaio com peixes (*Pimephales promelas*), utilizando a metodologia descrita pela norma-ABNT NBR 15499/2007 (ABNT, 2007) observando a sobrevivência e crescimento dos indivíduos por sete dias. Foram utilizadas cinco concentrações de amostra (6,25%; 12,5%; 25%; 50% e 100%).

Ensaio com microcrustáceos (*Ceriodaphnia dubia*), utilizando a metodologia descrita pela norma ABNT NBR 13373/2005 (ABNT, 2005) - em que foi observada a sobrevivência e o número de filhotes por indivíduos durante sete dias. Foram utilizadas cinco concentrações de amostra (6,25%; 12,5%; 25%; 50% e 100%).

Ensaio com algas *Pseudokirchneriella subcaptata* (*Selenastrum capricornutum*) utilizando a metodologia descrita pela norma ABNT NBR 12648/2005 (ABNT, 2005) - em que foi observada a inibição do crescimento por sete dias. Foram utilizadas oito concentrações de amostra (0,78%; 1,56%; 3,12%; 6,25%; 12,5%; 25%; 50% e 100%).

Os resultados para toxicidade aguda do efluente foram expressos pelo Fator de toxicidade (FT). Este representou quantas vezes o corpo receptor precisaria diluir o efluente para que este não cause morte aos organismos ali presentes. Assim sendo, o FT=1 indicou ausência de toxicidade aguda do efluente em sua forma integral. Outra forma em que os resultados foram expressos foi através da concentração da amostra responsável pelo efeito em 50% dos organismos teste. Estas concentrações foram expressas por CE50= concentração de

efeito, CL50= concentração letal ou CI50= concentração de inibição. Quanto mais baixo se mostrou este valor, mais elevada a toxicidade da amostra (ARENZON et al., 2011).

Nos ensaios de toxicidade crônica foi definida a concentração de efeito não observado (CENO), que informou a mais alta concentração de efluente que não iria afetar o crescimento, reprodução ou mobilidade dos organismos-teste. Outra informação importante nos resultados foi a concentração de efeito observado (CEO) que informou qual concentração os efeitos ainda não modificou o comportamento ou sobrevivência dos organismos (ARENZON et al., 2011), portanto, quanto maior o CENO e o CEO menor a toxicidade da amostra.

Os testes de toxicidade aguda e crônica foram realizados pelo laboratório Ecotox Análise e Consultoria Ambiental Ltda.

2.9.2 Testes de toxicidade com solo

2.9.2.1 Ensaio de fuga de *Eisenia andrei*

O ensaio foi realizado seguindo a norma ISO 17512-1 (2008). Para controle foi utilizado o solo artificial tropical em que o *Sphagnum* (musgo que no solo artificial ajuda na manutenção da umidade) foi substituído por pó de casca de coco, além do solo-teste (SI).

Os organismos utilizados foram da espécie *Eisenia andrei*, peso médio de $0,42 \pm 0,07$, com clitelo, criados no Laboratório de Ecotoxicologia do Centro de Tecnologia Mineral - CETEM.

O ensaio foi realizado em duplicata: solo-teste (SI) x solo artificial tropical, além do controle com solo artificial tropical. O recipiente-teste foi o de câmara com duas seções. Foram utilizados 500 g de peso seco de substrato umedecido a 40% da capacidade máxima de retenção de água (CMRA: solo-teste = 51% e solo artificial tropical = 70%). Os substratos

foram umedecidos com água deionizada, sendo que o ensaio foi realizado em Incubadora Tecnal com temperatura a 21° C e foto período de 16 h claro/8 h escuro, durante 24 h.

Este ensaio foi realizado no laboratório de ecotoxicologia do Centro de Tecnologia Mineral, no Rio de Janeiro, RJ em colaboração com o Programa de Pesquisas Ambientais - Laboratório de Mutagênese Ambiental da FEPAM.

2.10 Ensaio de genotoxicidade

2.10.1 Testes de *Salmonella/microsoma*: atividade mutagênica e citotóxica

2.10.1.1 Método de microssuspensão - Teste de Kado

Este procedimento (KADO et al., 1983) se constitui em uma modificação do ensaio clássico, sendo dez vezes mais sensível, permitindo avaliar menores concentrações da amostra. Este ensaio foi realizado nas amostras de efluente bruto, nos extratos orgânicos e ácidos do efluente final tratado e do solo. O teste foi empregado com pré-incubação de 90 minutos, sendo utilizadas as linhagens que medem erros no quadro de leitura, TA98 e TA97a, sendo a segunda sensível a metais pesados (PAGANO & ZEIGER, 1992) e substituição de pares de bases, TA100 e TA102, sendo a segunda sensível a danos oxidativos (MARON & AMES, 1983). Para melhor caracterizar os extratos orgânicos do solo foram ainda utilizadas as linhagens específicas para definir presença de nitroderivados, YG1041 e YG1042 que detectam mono e dinitro compostos (em testes em ausência de metabolização), respectivamente por erro no quadro de leitura ou substituição de pares de bases (UMBUZEIRO & VARGAS, 2003).

As amostras testadas foram avaliadas por uma curva de diferentes diluições do efluente em sua forma total, seus extratos e extratos do solo. As diluições para efluente bruto foram inicialmente: 50 µl; 100 µl; 150 µl; 200 µl; 300 µl e 400 µl, porém as dosagens acima de 200 µl mostraram-se tóxicas, para a realização efetiva dos testes foram utilizadas diluições de: 12,5 µl; 25 µl; 50 µl; 100 µl; 150 µl e 200 µl; para extratos orgânicos e ácidos do efluente: 10 ml, 5 ml, 2,5 ml, 1,25 ml e 0,065 ml de efluente equivalente; para extrato orgânico do solo dosagens de 5 mg, 10 mg, 20 mg, 40 mg, 80 mg, 120 mg de solo seco equivalente e extrato ácido do solo 25 mg, 50 mg, 75 mg, 100 mg, 150 mg, 200 mg de solo seco equivalente.

A atividade mutagênica foi expressa pelo número do número de revertentes por unidade da amostra testada (revertentes/mg de solo seco equivalente ou revertentes/ml de efluente equivalente) calculado na porção linear da curva dose-resposta, analisada no programa SALANAL (Análise de Salmonella de Ensaio, a versão 1.0 do Research Triangle Institute, RTP, North Carolina, EUA), selecionando os modelos linear ou *Bernstein*. A amostra foi considerada mutagênica quando a ANOVA e análise de regressão foram significativas ($p \leq 0,05$) e indicativa de mutaagenicidade em presença de um dos dois critérios (VARGAS et al., 1993; SILVA JUNIOR & VARGAS, 2009).

Resposta citotóxica: A amostra e a cultura, após incubação, foram diluídas com tampão, semeadas em meio rico completo e incubadas por 72 horas a 37°C, obtendo-se o resultado em colônias sobreviventes/placa. A amostra foi considerada citotóxica quando o percentual de células sobreviventes na amostra foi inferior a 60% da observada no controle negativo (VARGAS et al., 1993).

Sistema de metabolização hepática: Os testes, nas diferentes metodologias, foram realizados na presença e na ausência de um sistema de ativação metabólica *in vitro*, a fração microsossomal – hepática S9 (adquirida da MOLTOX, USA). Esta era composta por um

homogenato de células de fígado de rato *Sprague-Dawley* pré-induzidos com AROCOLOR (MARON & AMES, 1983; UMBUZEIRO & VARGAS, 2003).

2.10.1.2 Ensaio de Ames clássico de acordo com a norma ISO 16240 (2005)

Foi utilizado como alternativa para determinar a atividade mutagênica no efluente bruto tratado, através do teste *Salmonella*/microsoma no procedimento com pré-incubação por 20 minutos, em uso para amostras de efluentes, pela comunidade europeia (ISO 16240, 2005). Foram utilizadas as linhagens TA98 e TA97a, para detecção de mutagênicos por erro no quadro de leitura, sendo que a última é sensível a metais (PAGANO & ZEIGER, 1992); TA100, que caracteriza substituição de pares de bases (MARON & AMES, 1983). A cepa TA 97a não está contemplada na norma ISO 16240, porém foi utilizada nos ensaios para análise comparativa desta metodologia com o teste de Kado. As amostras foram avaliadas por uma curva de diferentes diluições do efluente bruto, sendo a primeira, 1 ml de efluente filtrado e as demais diluídas com água deionizada nas proporções de $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$ e $\frac{1}{16}$. A atividade mutagênica foi expressa a partir do número de revertentes/placa obtidos nas diluições da amostra subtraídos do número de revertentes/placa observados no controle negativo. A amostra foi considerada mutagênica quando os valores obtidos eram superiores a 20 revertentes/placa para TA98 e 80 revertentes/placa para TA100 e TA97a.

Assim como o Teste de Kado todas as análises foram realizadas com e sem a metabolização hepática através de um sistema de ativação metabólica *in vitro*, a fração microsomal – hepática S9 (adquirida da MOLTOX, USA). Além de avaliação das respostas citotóxicas em meio enriquecido, através de curvas de sobrevivência, onde a amostra e a cultura, após incubação, foram diluídas com tampão, semeadas em meio rico completo e incubadas por 48 horas a 37°C, obtendo-se o resultado em colônias sobreviventes/placa. A

amostra foi considerada citotóxica quando o percentual de células sobreviventes na amostra foi inferior a 60% da observada no controle negativo (VARGAS et al., 1993).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análises físicas e químicas

Neste estudo foram realizadas análises físicas e químicas, incluindo metais no efluente e no solo, além de metais nos vegetais que foram plantados em áreas que recebem irrigação (SI) desse efluente de indústria metal mecânica e no solo não irrigado (SR). Esses parâmetros foram avaliados com base na legislação ambiental nacional vigente visando não alterar as condições naturais do solo receptor. No entanto, deve ser considerado que as legislações atuais estabelecem padrões para lançamento de efluentes líquidos em recursos hídricos, sendo necessária a definição de normas específicas para sua aspersão em solo. Ainda estes parâmetros observados no solo foram comparados às normas internacionais.

Além destas análises, a presença no efluente industrial de insumos orgânicos provenientes do esgotamento sanitário, tintas, solvente e outros componentes motivaram quantificar os 16 HPAs prioritários pela USEPA/CWA, 2007, entre estes os oito que possuem potencial carcinogênico (IARC, 2013), além de verificar a presença de compostos orgânicos voláteis.

O histórico da área que atualmente recebe efluente industrial tratado foi, por cerca de 40 anos, local de cultura de soja, trigo, milho e aveia, justificando uma análise de traços residuais dos agrotóxicos utilizados nestas monoculturas.

3.1.1 Parâmetros físicos e químicos do efluente e das amostras de solo

Na Tabela 3 foram descritas as análises físicas e químicas do efluente tratado. Dos parâmetros legislados (BRASIL, 2011 e RIO GRANDE DO SUL, 2006a) somente os níveis de N e P totais ultrapassaram os padrões de emissão de efluente para águas superficiais. Para os demais parâmetros os níveis estão dentro dos padrões relatados no histórico da área, sendo considerados de baixo risco para irrigação (Processo FEPAM nº 0366/2011).

Tabela 3 - Valores dos parâmetros físico-químicos encontrados no efluente industrial tratado, comparando-os com os padrões de lançamento em águas superficiais.

Parâmetros	Unidade	LD	Valores	¹ CONAMA 430	² Consema 128
Profundidade da coleta	M		0,2	⁴ NP	NP
Temperatura da água	°C		25	< 40°C	< 40°C
pH (a 20°C)			6,9	5 a 9	6 a 9
³ Vazão	m ³ /dia		144	NP	NP
DQO	mg DQO/l		81,6	NP	NP
Sólidos sedimentáveis	mg/l		< 0,1	≤ 1	≤ 1
Sólidos suspensos totais	mg SST/l		69	NP	NP
Condutividade	µS/cm		3680	NP	NP
Carbono Orgânico Total	mg/l		127,8	NP	NP
Nitrogênio Total Kjeldahl	mg/l	0,1	63	NP	20
Sulfato	mg/l	1	482	NP	NP
Cloreto	mg Cl-/l	1	484	NP	NP
Dureza	mg/l	5	563	NP	NP
Fósforo Total	mg/l	0,01	6,4	NP	3

¹BRASIL,2011- Resolução nacional que dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005- valores máximos para lançamento de efluentes em recursos hídricos; ²RIO GRANDE DO SUL, 2006a, Resolução estadual que dispõe sobre a fixação de padrões de emissão de efluentes líquidos para fontes de emissão que lancem seus efluentes em águas superficiais no estado do Rio Grande do Sul- valores máximos para lançamento de efluentes em recursos hídricos; ³Vazão -vazão do efluente referente a saída final da lagoa de tratamento; ⁴DQO- Demanda química de oxigênio; NP padrões não definidos na legislação.

Em relação ao N total, que apresentava histórico de valores (7,0; 3,3; 1,7 mg/l) dentro dos padrões da legislação vigente (20mg/l; RIO GRANDE DO SUL, 2006a), mostrou uma elevação para 63 mg/l. Já o parâmetro P Total que apresentava em geral um histórico de dados de 4,7; 3,6 e 2,0 mg/l, em geral acima do padrão recomendado (3mg/l; RIO GRANDE DO

SUL, 2006a) apresentou no presente estudo, aumento de aproximadamente 1,5 vezes o limite legislado.

Os compostos de N são considerados macronutrientes para processos biológicos, pois, depois do C, este é o elemento mais exigido pelas células vivas. Quando liberados nas águas naturais juntamente com o P, além de outros nutrientes presentes nos efluentes, provoca o enriquecimento do meio possibilitando o crescimento dos seres vivos, especialmente as algas, podendo gerar eutrofização e justificando, assim, a sua limitação nas legislações para recursos hídricos (RIO GRANDE DO SUL, 2006a ; BRASIL, 2011).

Na Tabela 4 estão descritos os parâmetros físicos e químicos do solo, incluindo os micro e macronutrientes. Todos os valores encontrados em SI, com exceção dos teores de argila, estão mais elevados do que em SR. Em específico os nutrientes N e P foram considerados na literatura (ARIENZO et al., 2009) uma fonte de enriquecimento na irrigação resultando em economia potencial de custo de fertilizantes. Para Kiziloglu et al. (2008), a utilização de águas residuais para a irrigação foi considerada uma solução técnica para minimizar a degradação do solo e para restaurar o seu teor de nutrientes. Feigin et al. (1991) relata que efluentes contêm, muitas vezes, altas concentrações de nitrogênio orgânico, o qual é susceptível a decomposição microbiana do solo que o transforma em compostos inorgânicos simples disponíveis às plantas, como amônia e nitrato. Desta forma os valores elevados de N e P no efluente investigado no presente estudo (tabela 3) poderiam beneficiar a fertilidade do solo.

Valores mais elevados de P total foram observados no SI em relação a SR (Tabela 4) o que nos leva a inferir que esta substância pode estar se acumulando no solo a partir do aporte oriundo do efluente tratado. Al Nakshabnadi et al. (1997) observaram um aumento significativo nos teores de P e na salinidade do solo, quando este era irrigado com efluente industrial, porém outros autores relataram que a disposição de efluente no solo não exerceu

influência no teor de P independente da água de irrigação utilizada (FONSECA, 2001; KOURAA et al., 2002). Esses autores destacaram ainda que para ocorrer mudanças nas características químicas do solo são necessários vários anos de irrigação, visto que a dinâmica de acúmulo de P ocorre muito lentamente.

Tabela 4 - Parâmetros físicos e químicos dos solos irrigados (SI) e de referência (SR).

Parâmetro	Unidade	SI	SR
Argila	%	50	50
pH		6,3	5,9
Fósforo – P	mg/kg	5	3,4
Potássio – K	mg/kg	>400	59
¹CTC	cmol/kg	11,9	10,3
²% SAT da CTC	%	86	78

¹CTC - capacidade de troca de cátions é a capacidade do solo de adsorver os nutrientes (íons positivos) e mantê-los disponíveis para as plantas; ²% SAT da CTC valor de saturação de bases da capacidade de troca de íons na camada mais superficial do solo.

Ainda foi observado no presente estudo elevação dos teores de K, SI, em cerca de dez vezes em relação a SR. Arienzo et al. (2009) ressaltaram que o K, além de suas funções bioquímicas, melhora a tolerância da planta a várias situações de estresse, como a seca, baixa temperatura ou salinidade. Porém a irrigação com águas residuais pode resultar na disponibilidade de K, em excesso para as necessidades da planta. Assim, a aplicação a longo prazo de tais águas residuais pode causar o acúmulo de K no solo e diminuir a sua condutividade hidráulica. Este processo é visto como um problema em potencial em decorrência do efeito que poderia ter sobre o aumento da salinidade no solo (ARIENZO et al., 2009).

Ao compararmos o percentual de matéria orgânica do solo em estudo (2,1% em SI) e (1,7% em SR) com solo argiloso no estado do Rio Grande do Sul, como o avaliado por Ferreira et al. (2003) (percentuais de 25% e 13 %), pode-se observar que tanto SI quanto SR

possuem percentuais baixos de matéria orgânica. Estas amostras apresentaram índices elevados de troca catiônica (CTC), uma vez que como ambos se caracterizam como solos argilosos, possuem boa capacidade de adsorver os nutrientes (íons positivos), mantendo-os disponíveis para as plantas. (EMBRAPA, 1989; FERREIRA et al., 2003).

3.1.2 Teores de metais no efluente tratado e no solo-receptor

Na Tabela 5 estão descritos os teores de metais detectados no efluente industrial comparados com os padrões de lançamento em águas superficiais nacionais (BRASIL, 2011) e estaduais (RIO GRANDE DO SUL, 2006a). Pode-se observar que somente os níveis de Ni se apresentaram próximos aos limites da legislação mais restritivos (RIO GRANDE DO SUL, 2006a).

Tabela 5 - Teores de metais do efluente industrial tratado e padrões de lançamento em águas superficiais.

Metais	Unidade	LD	Teores	¹ CONAMA 430	² CONSEMA 128
Alumínio - Al	mg/l	0,01	0,175	³ NP	10
Cobre - Cu	mg/l	0,005	< 0,005	1	0,5
Cromo - Cr	mg/l	0,01	< 0,01	1,0	0,5
Zinco-Zn	mg/l	0,01	0,408	5	2
Boro-B	mg/l	0,01	0,035	5	5
Manganês-Mn	mg/l	0,01	0,155	1	1
Chumbo-Pb	mg/l	0,01	<0,01	0,5	0,2
Arsênio- As	mg/l	0,01	<0,01	0,5	0,1
Bário-Ba	mg/l	0,01	0,033	5	5
Cádmio-Cd	mg/l	0,001	<0,001	0,2	0,1
Estanho-Sn	mg/l	0,01	< 0,01	4	4
Ferro - Fe	mg/l	0,01	0,082	15	10
Lítio-Li	mg/l	0,01	< 0,01	NP	10
Merúrio-Hg	mg/l	0,000075	< 0,00007	0,01	0,01
Molibdênio-Mo	mg/l	0,01	< 0,01	NP	0,5
Níquel-Ni	mg/l	0,01	0,804	2	1
Prata- Ag	mg/l	0,01	< 0,01	0,1	0,1
Selênio-Se	mg/l	0,008	< 0,008	0,3	0,05
Vanádio -V	mg/l	0,01	< 0,01	NP	1

¹BRASIL,2011 - Resolução nacional que dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005- valores máximos para lançamento de efluentes em recursos hídricos; ² RIO GRANDE DO SUL, 2006a - Resolução estadual que dispõe sobre a fixação de Padrões de Emissão de Efluentes Líquidos para fontes de emissão que lancem seus efluentes em águas superficiais no estado do Rio Grande do Sul- valores máximos para lançamento de efluentes em recursos hídricos ; ³NP padrões não definidos em legislação

Na Tabela 6 estão descritos os teores de metais obtidos nas amostras de SI e SR comparados com valores orientadores para solos em normas nacionais e internacionais. A maioria dos teores de metais analisados tanto em SI como em SR apresentaram-se abaixo dos

recomendados nessas legislações, com exceção de Ni, Hg e Pb na norma mais restritiva (CETESB, 2005).

Tabela 6 - Análise comparativa dos teores de metais no solo irrigado (SI) e de referência (SR) em relação a valores orientadores para solo recomendados em legislação.

Parâmetro	Unidade	LD	SI	SR	¹CETESB	²CONAMA 420	³Holanda
Arsênio -As	mg/dm ³	3	< 2	< 2	3,5	15	29
Bário -Ba	mg/dm ³	10	59	61	75	150	200
Boro - B	mg/dm ³	0,1	0,4	0,3	⁴ NP	NP	NP
Cádmio - Cd	mg/kg	0,004	<0,2	<0,2	< 0,5	1,3	0,8
Chumbo - Pb	mg/kg	0,02	15	18	17	72	85
Cobre - Cu	mg/dm ³	3	5,6	5,5	35	60	20
Cromo - Cr	mg/dm ³	12	33	32	40	75	100
Cromo Hexavalente- Cr⁶	mg/dm ³	0,008	<1	<1	NP	NP	NP
Cromo Trivalente – Cr³	mg/dm ³	12	33	32	NP	NP	NP
Enxofre - S	mg/dm ³	10	118	34	NP	NP	NP
Ferro - Fe	mg/dm ³	0,1	1,3	1,2	NP	NP	NP
Manganês-Mn	mg/dm ³	0,04	18	32	NP	NP	NP
Mercúrio - Hg	mg/dm ³	0,01	0,07	0,06	0,05	0,5	0,3
Molibdênio - Mo	mg/kg	0,04	<0,2	<0,2	< 4,0	30	10
Níquel - Ni	mg/kg	0,008	29	22	13	30	35
Selênio - Se	mg/dm ³	1	< 4	< 4	0,25	5	NP
Zinco - Zn	mg/dm ³	0,06	2,6	1,2	60	300	140

¹CETESB, 2005- normativa da Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental que dispõe sobre a aprovação dos Valores Orientadores para Solos e Águas Subterrâneas no Estado de São Paulo – valores de referência; ²BRASIL, 2009- Resolução Nacional que dispõe sobre critérios e valores de prevenção para qualidade do solo; ³Holanda – lista holandesa de valores de referência para qualidade do solo e da água subterrânea; ⁴NP padrões não definidos em legislação.

Na Tabela 7 pode-se observar que os teores de Ni encontrados no solo estão acima dos valores de referência e próximos aos de alerta (13 e 30 mg/kg respectivamente) para SI de acordo com a norma mais restritiva (CETESB, 2005). Em relação ao Hg também foram observadas concentrações levemente superiores aos de referência, tanto para SI como para SR e quanto ao Pb, os valores apresentam-se próximos aos níveis orientadores de referência.

Tabela 7 - Valores orientadores da CETESB para solo no Estado de São Paulo/2005 em relação aos metais de interesse.

Metal	Unidade	¹ SI	² SR	Valores orientadores para solo				
				³ Ref	Alerta	⁴ Ag./Ap max	Res.	Ind.
Ni	mg/kg	29	22	13	30	50	200	300
Hg	mg/kg	0,07	0,06	0,05	0,5	12	36	70
Pb	mg/kg	15	18	17	100	200	350	1200

¹SI amostra de solo aspergido com efluente; ²SR solo que não recebe aspersão de efluente; ³Ref, referência; ⁴Ag,Ap Max aporte máximo de efluente em solo agrícola;

Comparando as Tabelas 5 e 6 pode-se observar que os níveis de Ni encontrados no solo podem refletir um acúmulo a partir do efluente aspergido que apresenta teores (0,8 mg/l) próximos aos limites recomendados na legislação estadual (1,0 mg/l; CONSEMA 128) (RIO GRANDE DO SUL, 2006a).

Pode-se observar teores mais elevados de Ni em SI em relação a SR (29 mg/kg no SI e 22 mg/kg no SR), sugerindo o incremento desta substância pela aspersão do efluente nesta área.

Resultados obtidos pela CETESB (2001) em solos do estado de São Paulo, indicam a faixa de 1,55 a 73,5 mg/kg para Ni. Caridad Cancela et al. (2002), relataram variação nos teores totais de Ni em amostras de solo contaminado do estado de São Paulo de 14,8 a 50,2 mg/kg. Os teores observados neste estudo, tanto em SI como SR estão dentro desta variação de valores, sugerindo enriquecimento antrópico.

Em relação ao Hg, apesar dos níveis não detectados no efluente (Tabela 5) foram observados valores levemente acima dos orientadores de referência (0,05 mg/kg) para CETESB (2005) no solo (0,07 mg/kg em SI e 0,06 mg/kg em SR), embora inferiores aos recomendados pela legislação nacional e internacional (Tabela 6). Rodrigues (2002) apontam que a média da concentração de Hg no solo, considerando diversos países do mundo, foi de 0,05 mg/kg, sendo que a variabilidade de Hg observada em solo urbano

Europeu foi de 0,015 a 6,3 mg/kg. Os teores médios mais baixos foram encontrados em Aveiro (Portugal), tanto para a superfície (0-10 cm) como sub-superfície (10-20 cm), 0,055 e 0,054 mg/kg, respectivamente. Estas áreas foram descritas como de baixa toxicidade para Hg, com teores próximos aos encontrados no presente estudo. Fang et al. (2011) observaram teores de Hg em solo urbano de diferentes áreas de Wuhu na China variando entre 0,024–2,844 mg/kg, com média de 0,207mg/kg. Os autores consideraram estes teores como de pouco risco à saúde humana. Como os valores observados no solo aspergido pelo efluente em análise foram menores, podemos inferir que o Hg presente em SI não gera perigo à saúde humana até este momento.

3.1.3 Análise quantitativa de metais nos vegetais

Foram realizadas análises nas folhas de eucaliptos (*Eucalyptus grandis*) e folhas e raízes de gramíneas (*Lolium multiflorum*), priorizando a comparação entre os teores de metais no solo (SI e SR) e nos vegetais (tabela 8). Foi possível observar acúmulo maior nas raízes de *L. multiflorum* em relação às folhas. Dos metais priorizados, o Fe apresentou valores mais elevados tanto para vegetais coletados em SI como SR, embora com teores bastante baixos nos solos e também no efluente aspergido. A origem deste acúmulo observado nos vegetais deve ser investigada. Com menor intensidade os metais Al, Ba, B, Pb, Cu, Cr, Mn, Mg, Ni e Zn também se mostraram mais elevados nas raízes de *L. multiflorum* em relação à parte aérea dos vegetais avaliados. No entanto, comparando as raízes analisadas em SI e SR as concentrações dos metais observados em SI foram superiores em 50% dos elementos analisados, 35,7% iguais e em 14,3% dos casos inferiores. Pais & Jones (1997), estudando alguns desses metais, observaram como valores usuais para espécies vegetais: 1,0-1,7mg/kg

As; 0,05-0,2mg/kg Cr e 5-30mg/kg Cu, sendo que com exceção do As, os demais teores observados no presente estudo estão acima desses valores.

Tabela 8 - Comparação dos teores de metais presentes em vegetais em relação aos níveis observados no solo.

Metais	¹ L.D.	Unidade	² F. E. <i>grandis</i> em SI	³ F. L. <i>multiflorum</i> SI	F. L. <i>multiflorum</i> SR	⁴ R. L. <i>multiflorum</i> SI	R. L. <i>multiflorum</i> SR	⁵ SI	⁶ SR
Alumínio – Al	1	mg/kg	92	345	674	30168	16871	⁷ NP	NP
Arsênio – Ar	1	mg/kg	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 2	< 2
Bário - Ba	1	mg/kg	12	14	24	104	31	59	61
Boro – B	1	mg/kg	15	13	19	288	241	0,4	0,3
Cádmio – Cd	0,1	mg/kg	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,2	< 0,2
Chumbo – Pb	1	mg/kg	< 1	< 1	< 1	5,9	7,2	15	18
Cobre - Cu	1	mg/kg	13	12	12	113	80	5,6	5,5
Cromo - Cr	1	mg/kg	1	1	1,5	23	26	33	32
Ferro - Fe	1	mg/kg	201	843	1311	42894	54737	1,3	1,2
Manganês – Mn	1	mg/kg	376	75	79	859	493	18	32
Mercúrio – Hg	0,05	mg/kg	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	0,07	0,06
Molibdênio – Mo	1	mg/kg	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 2	< 0,2
Níquel - Ni	1	mg/kg	11	13	1,1	77	9,8	29	22
Selênio - Se	1	mg/kg	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 4	< 4
Zinco - Zn	1	mg/kg	29	39	21	143	73	2,6	1,2

¹L.D. limites de detecção; ²F.E. *grandis* folhas de *Eucaliptus grandis*; ³F.L. *multiflorum* folhas de *Lolium multiflorum*; ⁴R..L. *multiflorum* raízes de *Lolium multiflorum*; ⁵ SI solo irrigado; ⁶ SR solo de referência; ⁷ NP não há parâmetros

Alguns metais tais como Mn, Fe, e Zn são constituintes do solo e comumente presentes em altas concentrações. No entanto, é importante enfatizar que a presença de Fe, bem como Ni e Pb, tem sido considerada como contribuinte para a mutagenicidade de amostras de solo em áreas contaminadas por usinas de carvão (SILVA JÚNIOR et al., 2009). Entre estes metais o Ni é considerado carcinogênico humano (tipo 1) e o Pb, possível carcinogênico humano (2b) (IARC, 2013), portanto, a liberação destes composto no ambiente

deve ser restringida. No presente estudo o Pb parece não apresentar bioacumulação nos vegetais, a partir do solo que se encontra em torno dos valores de referência pela legislação mais restritiva. Em relação ao Ni foi possível observar acúmulo deste metal nas folhas de *Eucalyptus grandis* (11 mg/kg) e *Lolium multiflorum* (13 mg/kg), sendo neste último também nas raízes de SI (77 mg/kg) a partir das concentrações acumuladas no solo em SI (29 mg/kg). Apesar dos valores observados em SR (22 mg/kg) estarem em ordem de grandeza similar não foi detectado o mesmo efeito de acumulação nas folhas e nas raízes. A comparação dos teores de Ni nas folhas de *L. multiflorum* em SI e em SR torna possível verificar que os vegetais irrigados apresentam concentrações 10 vezes maiores do que os que não são aspergidas. Pais & Benton Jones (1997) apresentaram os valores de 0,3 a 3,5 mg/kg como variação usual em plantas, sendo considerados tóxicos valores superiores a 50 mg/kg. Desta forma os dados atuais mostraram-se em geral elevados em relação à variação usual e tóxico nas raízes de *L. multiflorum* em SI, com elevação importante até este momento.

Piccini e Malavolta (1992) avaliaram diferentes cultivos de feijão, utilizando solução nutritiva. A produção de feijão foi inversamente proporcional à concentração de Ni na solução que irrigava estes vegetais. Estes autores observaram queda na produtividade de arroz e feijão cultivados em vasos, quando a dose de Ni estava acima de 30 mg/kg no solo, valor este muito próximo do encontrado (29 mg/kg). Isto justifica as restrições de uso dos vegetais plantados no SI.

Para as análises de teores de zinco em vegetais Arora et al. (2008) relataram que as concentrações mínimas e máximas de 14 e 42 mg/kg nos vegetais irrigados com água natural e 22 e 46 mg/kg em águas residuais, foram inferiores ao do presente estudo (80-113 mg/kg). No presente estudo as análises apresentaram concentrações de 39 mg/kg em folhas e 143 mg/kg nas raízes de gramínea (*L. multiflorum*) do SI e 21 mg/kg em folhas e 73 mg/kg em raízes do SR. Para folhas de eucalipto (*E. grandis*) do SI os valores foram de 29 mg/kg.

Estes teores para plantas foram inferiores ao limite de toxidez de 200 mg/kg, apresentado por Pais & Benton Jones (1997). É importante referir que os valores em solo e no efluente se encontraram reduzidos e dentro das recomendações de legislação para este elemento o acúmulo observado nos vegetais parece informar que este metal está sendo absorvido, provocando um decréscimo em seus teores no solo.

Comportamento similar ocorre com os demais constituintes naturais do solo, Mn e Fe. No entanto devido a potencialidade mutagênica do Fe e ausência de parâmetros normativos, as concentrações elevadas observadas nos vegetais podem ser avaliadas através da comparação com resultados de outros estudos. Arora et al. (2008) avaliando a acumulação de Fe em vegetais irrigados com águas não residuais observaram que a concentração deste apresentava valores mínimos e máximos de 79 mg/kg 340 mg/kg respectivamente. Quando irrigados com água residual estes valores aumentavam para 116 mg/kg e 378 mg/kg respectivamente. Se compararmos os valores encontrados para os teores de Fe nos vegetais irrigados com efluente industrial, no presente estudo, foram encontrados valores mais elevados, pois os teores variaram de 201 mg/kg em folhas de *E. grandis* a 42894 mg/kg em raízes de *L. multiflorum* em SI. Sendo importante relatar que os valores observados em raízes de SR foram mais elevados (54737 mg/kg). Outros autores que avaliaram teores de Fe em vegetais irrigados com águas residuais, também relataram valores menores do que os observados no presente estudo (LOPES et al., 2012; YADAV et al., 2013), sugerindo acumulação deste metal nos tecidos das plantas.

O cobre apesar de ser um metal essencial a manutenção da vida como um micronutriente, quando em estado iônico livre, possui potencial de bioacumulação e seu excesso pode desencadear resposta tóxica (APPEL et al., 2007; ZAGATTO & BERTOLETTI, 2008; PORHEN, 2012). Arora et al (2008) apresentaram dados para os níveis

de cobre resultados de variação de 2,5 a 10,9 mg/kg, que foram superiores aos encontrados nas raízes do presente estudo (89 -113mg/kg).

Já em relação ao Cr os valores observados não mostraram acúmulo tanto no solo como nos vegetais, estando dentro de parâmetros recomendados no efluente tratado e no solo. Em relação ao acúmulo em vegetais, Pais & Benton Jones (1997) observaram que o teor de Cr na parte aérea de plantas de áreas não contaminadas variou, na maior parte dos casos revisados, de 0,2 a 1,0 mg/kg. Kabata-Pendias e Pendias (1986) apresentaram, em estudo semelhante, uma variação de 0,02 a 10,0 mg/kg. Nenhum destes trabalhos revelou, entretanto, níveis tóxicos de Cr na parte aérea das plantas. Os valores do presente estudo encontram-se dentro da variação observada por estes autores nas folhas, para áreas não contaminadas, embora já sejam observados teores mais elevados do metal nas raízes (23mg/kg em SI e 26 mg/kg em SR).

Na Tabela 9 estão reunidos os valores permitidos de acúmulo de metais nos vegetais com base em legislações que regulamentam os teores dessas substâncias para consumo como alimentos. É importante ressaltar que os vegetais plantados na área de estudo não se destinam ao consumo humano ou animal. Em relação às legislações destacadas na Tabela 9, observa-se um acúmulo superior ao recomendado nos teores de Pb, Cu, e Zn nas raízes de *L multiflorum* e Cr, Ni nas folhas e raízes. As, Cd, Mo, Hg e Se não foram detectados nas análises de metais deste estudo. Em relação a B, Ba, Fe, Hg e Mn, não foram referidos padrões nas legislações consultadas, que regulem a acumulação destes metais.

Tabela 9 - Análise quantitativa de metais presentes nos vegetais e legislações que regulamentam os teores dessas substâncias em vegetais.

Parâmetros	Unidade	¹ Indian Standard	² WHO /FAO	³ E.U	⁴ Decreto Brasileiro
Arsênio - As	mg/kg	⁵ NP	NP	NP	1
Bário -Ba	mg/kg	NP	NP	NP	NP
Boro -B	mg/kg	NP	NP	NP	NP
Cádmio- Cd	mg/kg	1,5	0,3	0,2	1
Chumbo-Pb	mg/kg	2,5	0,3	0,3	0,8
Cobre - Cu	mg/kg	30	40	20	30
Cromo - Cr	mg/kg	20	NP	1	0,1
Ferro- Fe	mg/kg	NP	NP	NP	NP
Manganês - Mn	mg/kg	NP	NP	NP	NP
Mercurio_ Hg	mg/kg	NP	NP	NP	NP
Molibdênio - Mo	mg/kg	NP	NP	NP	NP
Níquel - Ni	mg/kg	1,5	NP	11	5
Selênio - Se	mg/kg	NP	NP	NP	0,3
Zinco -Zn	mg/kg	50	60	50	50

¹Awashthi SK. Prevention of Food Adulteration, 2000; ²Codex Alimentarius. FAO/WHO Standards, 2007; ³Comissão de regulamentação da União Europeia que prevê teores de certos contaminantes presentes nos gêneros alimentícios, 2006; ⁴Decreto Brasileiro nº 55871 referente as normas reguladoras do emprego de aditivos para alimentos, 1965; ⁵NP não há parâmetro estabelecido.

Quando compara-se os resultados obtidos nas folhas e raízes analisadas com as concentrações dos metais observados no solo observa-se resultados que caracterizam bioacumulação. Dessa forma, apesar das vantagens evidentes de *L. multiflorum*, na biorremediação deste solo irrigado, cuidados especiais no descarte dessas plantas devem ser recomendados.

3.1.4 Análise de compostos orgânicos no efluente e no solo

3.1.4.1 Compostos orgânicos voláteis e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

Análises qualitativas de compostos orgânicos voláteis (VOC's) e quantitativas dos 16 hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) prioritários (USEPA, 2007), foram realizadas

no efluente e no solo, indicando respostas abaixo dos limites de detecção dos métodos utilizados.

Embora haja mais de cem diferentes HPAs, 16 deles são considerados como poluentes prioritários segundo o CWA - *Clean Water Act* (USEPA, 2007). A IARC (2013) estabelece oito deles como carcinogênicos ou potencialmente carcinogênicos: benzo[a]pireno (grupo 1, evidências suficientes de carcinogênese humana); dibenzo[a,h]antraceno (grupo 2A, provavelmente carcinogênicos para seres humanos); benzo[a]antraceno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, criseno, indeno[1,2,3-cd]pireno e naftaleno (grupo 2B, possivelmente carcinogênicos para seres humanos); e acenaftaleno, acenafteno, antraceno, benzo[g,h,i]perileno, fenantreno, fluoranteno, fluoreno e pireno (classificados no grupo 3, não carcinogênicos ao homem).

Em decorrência destes resultados não foi realizada a análise de presença destas substâncias orgânicas e HPAs nos vegetais.

3.1.4.2 Análise quantitativa de agrotóxicos no solo

A contaminação ambiental causada pelo uso crescente e, algumas vezes, indiscriminado de agrotóxicos ou pesticidas tem gerado preocupações quanto ao lançamento inadequado desses compostos no solo. Esta prática representa uma das possíveis fontes de contaminação deste compartimento ambiental nas áreas agrícolas. Os agrotóxicos se caracterizam como substâncias tóxicas persistentes, pois podem se acumular, sendo de difícil degradação pela biota edáfica.

Para investigar a influencia desses compostos nas análises de toxicidade no solo, foi realizada a análise quantitativa dos principais agrotóxicos (ácidos clorados, carbamatos, compostos organoclorados e compostos organofosforados) (Processo FEPAM nº 0366/2011)

que poderiam estar presentes de forma residual neste solo, considerando o histórico agrícola da área. Esta análise não mostrou valores acima do limite de detecção dos métodos utilizados.

3.2 Testes de toxicidade do efluente

3.2.1 Ensaio de toxicidade com organismos aquáticos e terrestres

A aplicação de ensaios de toxicidade em análises de misturas complexas, como efluentes industriais, permitem a identificação da presença de agentes químicos, através dos efeitos aos organismos teste, relacionando as consequências observadas nas análises aos danos provocados à biota, quando lançados no ambiente. Tais ensaios no Brasil são previstos por lei ambiental, para avaliar os efeitos tóxicos agudos e crônicos do efluente tratado (BRASIL, 2011- art. 18).

O efeito agudo pode ser definido como o resultado de uma exposição a substâncias potencialmente tóxicas, resultando em danos biológicos severos ou na morte do organismo-teste (ARAGÃO & ARAÚJO, 2006). Constituem-se numa resposta dos organismos-testes a um estressor ou mistura de substâncias em análise que se manifesta, em geral, num intervalo de zero até 72 horas de exposição. No efeito crônico, os sintomas repetem-se com frequência ou desenvolvem-se lentamente por longo período de tempo, que pode abranger parte ou todo o ciclo de vida do organismo-teste (PANKRATZ, 2001).

Na tabela estão descritos os resultados observados para os ensaios de toxicidade aguda e crônica utilizando *P. promelas*, *C. dubia* e *P.subcaptata*.

Tabela 10 - Testes para medir toxicidade aguda e crônica para três níveis tróficos.

Concentrações	<i>Pimephales promelas</i>	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	<i>Pseudokirchneriella subcaptata</i>
0,78%	Concentração não avaliada	Concentração não avaliada	Nenhum efeito
^a 1,56%	Concentração não avaliada	Concentração não avaliada	Nenhum efeito
^b 3,12%	Concentração não avaliada	Concentração não avaliada	Toxicidade crônica
6,25%	Nenhum efeito	Nenhum efeito	Toxicidade crônica
12,5%	Nenhum efeito	Toxicidade crônica	Toxicidade crônica
25%	Nenhum efeito	Toxicidade aguda	Toxicidade crônica
50%	Nenhum efeito	Toxicidade aguda	Toxicidade crônica
100%	Nenhum efeito	Toxicidade aguda	Toxicidade crônica

^aCENO(I): Concentração de Efeito Não Observado

^bCEO (I): Concentração de Efeito Observado

Toxicidade crônica: diferença estatisticamente significativa entre o efeito observado (crescimento em peso corporal, reprodução ou inibição do crescimento algáceo) entre os organismos expostos ao grupo controle e à amostra ensaiada.

Toxicidade aguda: diferença estatisticamente significativa entre o efeito observado (mortalidade, imobilidade ou a inibição do crescimento algáceo) entre os organismos expostos ao grupo controle e à amostra testada após 48h

Foi possível observar (Tabela 10) ausência de toxicidade aguda ou crônica para *P. Promelas*. No entanto, para *C. Dubia* foi detectada toxicidade crônica com observação de decréscimo da mobilidade a partir da concentração de 12,5% de efluente e toxicidade aguda a partir de 25% de concentração do efluente, nas condições de ensaio e toxicidade aguda (mortalidade nas primeiras 48h de exposição) para *C. dubia* nas concentrações de 25%, 50% e 100%.

Em relação às respostas com algas (*P. Subcaptata*) a amostra do efluente apresentou toxicidade crônica (inibição do crescimento algáceo) para as concentrações a partir de 6,15%. Na tabela 11 as respostas estão também apresentadas sob forma de fator de toxicidade (FT).

Tabela 11 - Resumo dos resultados dos testes de toxicidade do efluente, expressos em fator de toxicidade.

Parâmetro	<i>Pimephales promelas</i>	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	<i>Pseudokirchneriella subcaptata</i>
Toxicidade	¹ CL(I) ₅₀ ; 48h = Não detectado	² CE(I) ₅₀ ; 48h = 8,84%	³ CI(I) ₅₀ ; 48h = 6,15%
Fator de toxicidade	⁴ FT = 1	FT = 16	FT = 32

¹CL(I)₅₀; 48h = a concentração da substância em análise do efluente, que causa efeito agudo; ²CE (I)₅₀; 48h = a concentração da substância em análise do efluente, que causa efeito crônico em 50% dos organismos teste e ³CI(I)₅₀; 48h = a concentração da substância em análise do efluente, que causa efeito de inibição de crescimento em 50% dos organismos teste; ⁴FT= fator de toxicidade.

Segundo Arenzon, 2004 a variabilidade dos efeitos tóxicos pode estar relacionada com as diferenças nas sensibilidades dos organismos, a complexidade dos compostos presentes nas amostras, a biodisponibilidade de certas substâncias ou pode ser decorrente da presença de substâncias que não foram analisadas.

As algas são consideradas mais sensíveis que invertebrados e peixes de 30 a 50% dos casos (GEIS et al., 2000). Em seu estudo Rodrigues (2002) conclui que a alga *P. Subcaptata* pode ser um bom organismo-teste para indicar impactos ambientais, podendo inclusive ser mais sensível que outros organismos da biota aquática, quando expostos a um mesmo agente contaminante.

Visando atender as exigências da Resolução CONSEMA 129 (RIO GRANDE DO SUL, 2006b), para empresas com vazão de efluente superior a 500 m³/dia a amostra não deve apresentar toxicidade aguda acima do fator de toxicidade (FT) quatro para os organismos-testes e em 2014 atinge o prazo na legislação para ausência do toxicidade aguda em pelo menos três níveis tróficos, conforme definido no Art.9 da Resolução CONSEMA 129 (RIO GRANDE DO SUL, 2006b). Portanto, o efluente testado foi considerado tóxico para os organismos aquáticos testados.

Terra et al. (2009) avaliaram através de análises de toxicidade aguda e crônica com *Daphnia magna*, os impactos ambientais da dispersão de efluente de indústria petroquímica. Foram detectadas toxicidades em algumas amostras, mostrando índices de sobrevivência

abaixo do esperado e mesmo quando havia 100% de sobrevivência as taxas de natalidade ficaram menores do que o controle, até a ausência total de nascimentos em alguns sobreviventes.

Machado et al., 2012 ao avaliar a toxicidade aguda do efluente de uma indústria metal mecânica após diferentes formas de tratamento (precipitado e coagulado-floculado) utilizando *Daphnia magna* como organismo teste obteve resposta tóxica positiva com morte de 50% dos organismos (CE50) em dosagens menores do que a encontradas em nosso estudo (6,58% e 4, 75%). Nos dois tipos de tratamento do efluente industrial não houve diferença significativa, indicando que a adição do policloreto de alumínio (coagulante) e do polímero eletrólito (floculante) não agregou e nem removeu toxicidade aguda aos despejos de modo significativo ($p < 0,05$).

Entre maio de 2001 e março de 2002 foi realizada análise de toxicidade dos efluentes de curtumes localizados junto à bacia hidrográfica dos rios Feitoria e Cadeia no estado do Rio Grande do Sul. Foram utilizados como organismos teste *Daphnia magna*, *Danio rerio* e *Vibrio fisheri*. O organismo mais sensível à toxicidade, indicando os pontos mais impactados foi *V. fisheri*, seguido por *D. magna*. Foi utilizado também como organismo teste *Scenedesmus subspicatus* sendo observado nos ensaios crescimento algáceo provocado pela presença de nutrientes, devido ao lançamento de esgotos domésticos, efluentes orgânicos ou nutrientes utilizados na adubação do solo. Um histórico de nove anos de análises mostrou redução nos valores de toxicidade em decorrência da maior exigência da FEPAM no licenciamento e redefinição dos critérios de produtividade/economia de insumos, por parte dos gerenciadores das atividades industriais (FEPAM, 2008).

Para avaliar a relação entre o efluente e o solo foram realizados bioensaios com o efluente a ser testado em solo artificial para medir toxicidade em *Eisenia fétida*, vegetais e microrganismos do solo (Processo FEPAM nº 0366/2011- DL).

O ensaio de letalidade para *Eisenia fétida* mostrou que no solo controle, umidificado com água bideionizada, houve ganho de peso de 4,87 mg por organismo teste enquanto no grupo teste, solo umidificado com o efluente industrial, perderam 6,19 mg de seu peso inicial. Não foi observado nenhum efeito de letalidade do efluente tratado para os organismos teste, porém esta amostra foi considerada tóxica para os organismos em relação ao crescimento, caracterizando toxicidade crônica.

No ensaio de fitotoxicidade do efluente (Processo FEPAM nº 0366/2011- DL); foram utilizadas três espécies de plantas *Oryza sativa* (arroz), *Raphanus sativus* (rabanete) e *Lactuca sativa* (alface). Não foram detectadas toxicidade na germinação das sementes e no crescimento de *Raphanus sativus* e *Lactuca sativa*. No entanto, para *Oryza sativa*, que necessita mais água no cultivo, quando esta foi substituída por efluente tratado, resultou em decréscimo no número de folhas, no crescimento do caule e da raiz em relação ao grupo controle, caracterizando resposta tóxica.

Para avaliar os efeitos tóxicos do efluente sobre microrganismos do solo foram medidas as taxas de respiração (ciclo de Carbono) e produção de nitratos (ciclo de Nitrogênio) presentes no Processo FEPAM nº 0366/2011- DL (FEPAM, 2011).

Para resultados significativos de toxicidade, as taxas precisam ambos precisam apresentar uma diferença superior a 25% entre a amostra e o controle. Para o ciclo de carbono o teste estatístico apresentou diferença percentual de 19,52% na amostra o que mostra a não toxicidade do efluente. Enquanto que no ciclo do nitrogênio foi necessário prolongar o ensaio por mais 14 dias, uma vez que o teste estatístico apresentou diferença percentual acima de 25% no 28º dia. Ao dar continuação ao ensaio esta diferença caiu para 10,73% evidenciando a resposta como não tóxica.

Assim sendo, os resultados dos três ensaios realizados pra avaliar a toxicidade do efluente em organismos terrestres, permitiu concluir que a toxicidade quando detectada se

manifestou através de efeitos crônicos, como perda de peso para *Eiseinia fétida*, comprometimento no crescimento de *Oryza sativa* ou tempo elevado para atingir a produtividade estatisticamente significativa de nitrato em relação aos microrganismos controles.

3.2.2 Ensaio de fuga de minhocas (*Eisenia andrei*)

No teste de fuga de *Eisenia andrei* foi analisado o comportamento de um organismo terrestre em solo que recebeu efluente, comparando os resultados com o comportamento deste mesmo organismo teste em solo artificial. Neste ensaio não houve mortalidade de organismos, assim como não foi observada nenhuma modificação morfológica nos organismos-teste.

O ensaio foi validado por não ter ocorrido mortalidade e o controle-duplo estar na faixa de frequência de distribuição observada para solo artificial tropical da ISO 17512-1/08. Na tabela 12 foram descritos os resultados obtidos ao final do ensaio. No solo-teste foram localizados, ao final do ensaio, 85% dos organismos-teste indicando que o solo-teste não possui função de habitat limitada, sendo até o momento considerado não tóxico para estes organismos.

Vale ressaltar que a aspersão do efluente no solo coletado e utilizado no ensaio de fuga, pode não apresentar efeitos de bioacumulação, pois a aspersão de efluente neste compartimento ambiental ocorre somente a dois anos (2011 e 2012).

Tabela 12 - Número de indivíduos por tipo de solo e média percentual entre as duas réplicas

Tipo do ensaio	Réplicas/substrato	Réplica 1	Réplica 2	Média (nº Organismos) e Resultados (%)
Teste	Solo-teste	9	8	8,5 – 85
	Solo artificial tropical	1	2	1,5 – 15
Controle duplo	Solo artificial tropical	3	8	5,5 – 55
	Solo artificial tropical	7	2	4,5 – 45

3.3 Ensaio de genotoxicidade

Genotoxicidade é uma das etapas necessárias na avaliação dos riscos ecológicos e à saúde humana conforme previsto em legislação para liberação de efluentes líquidos em recursos hídricos (RIO GRANDE DO SUL, 2006b) através do ensaio de mutação reversa ou teste de Ames, linhagens TA98 e TA100 na presença e ausência de sistema de metabolização exógeno (S9) e outras linhagens TA97a, TA102 e TA1535 na presença de justificativas pertinentes.

A escolha do ensaio *Salmonella*/microsoma no presente estudo se baseou nessa prerrogativa legal e por ser este o ensaio mais utilizado em trabalhos para avaliação de genotoxicidade no efluente e no solo (HOUK, 1992; WHITE & CLAXTON, 2004). Além disso, o ensaio é recomendado pela Sociedade Brasileira de Mutagenese Teratogênese e Carcinogênese Ambiental como um dos ensaios indicados na análise de produtos que possam causar danos à saúde humana e ao ambiente testando substâncias químicas puras ou em misturas incluindo amostras ambientais (SBMCTA, 2003).

Somam-se a estas evidencias as habilidades do ensaio *Salmonella*/microsoma em identificar substâncias carcinogênicas para roedores nas baterias de testes *in vitro*. O ensaio

apresenta percentuais de sensibilidade, habilidade de identificar resultados positivos em 53,8% e especificidade, habilidade em identificar resultados negativos, de 73,0%. Estes percentuais se elevam se forem adicionados outros ensaios *in vitro* que permitem avaliar danos cromossômicos (KIRKLANND et al., 2005).

3.3.1 Análises para avaliar mutagênese e citotoxicidade do efluente tratado

3.3.1.1 Ensaio *Salmonella/microsoma*: Teste de Kado

A tabela 13 apresenta as respostas de mutagenicidade para o efluente total e os extratos orgânicos preparados a partir desta amostra.

As análises do efluente obtiveram respostas significativas, indicando atividade mutagênica para erro no quadro de leitura e substituição de pares de bases no ensaio direto e após metabolização, respectivamente. Os valores em revertentes/mL da amostra foram na ordem de $510 \pm 151,8$ para a linhagem TA97a (-S9) e $780 \pm 136,9$ para TA100(+S9), (tabela 13), indicando que a mistura de compostos presentes no efluente total foi reativa com o material genético causando danos diversos (figura 4). As análises das amostras de extratos orgânicos de efluente e dos filtros (utilizados para preparação do efluente bruto) apresentaram respostas não mutagênicas para todas as linhagens testadas (dados não apresentados).

Nos extratos orgânicos realizados a partir do efluente bruto foi observada resposta indicativa para mutagênese na linhagem TA97a (+S9) em pH natural (tabela 13). No entanto não foram determinados HPAs nas análises do efluente acima dos limites de detecção do método. Da mesma forma também não foram identificados no efluente compostos orgânicos voláteis. Nos extratos ácidos do efluente bruto não foram observadas respostas significativas.

As amostras do efluente bruto mostraram citotoxicidade nas maiores dosagens, com a presença e ausência de S9, sendo a atividade mutagênica medida na porção linear da curva

dose resposta, eliminando as concentrações tóxicas. Nos extratos a citotoxicidade não foi detectada.

Tabela 13 - Análise da mutagênese do efluente final tratado por teste de Kado.

Linhagens	Efluente bruto filtrado	¹ CN	² CP	Extrato natural do efluente	CN	CP	Extrato ácido do efluente	CN	CP
TA98 ³(-S9)	⁵ -	36±13,7	296±40,3	-	45± 2	407± 40,3	-	45± 2	407±40,3
TA98 ⁴(+S9)	-	32±4,6	389±55 ,9	-	51± 20	303± 38,9	-	32± 4,9	393±59,7
TA97a (-S9)	⁶ 510 ±151,8	218±21,5	619±36,9	-	168 ±7,5	792± 36,7	-	168 ±7,5	792±36,7
TA97a (+S9)	-	173±3,4	809±19,8	⁷ ±	265 ±38,1	1232, 3 ±14,8	-	265 ±38,1	1232,3 ±14,8
TA100 (-S9)	-	179±23 ,5	1158±5 8,7	-	231 ±10,1	1424 ±50,9	-	231 ±10,1	1424±50, 9
TA100 (+S9)	780 ±136,9	193±10,1	2078±102,4	-	205 ±39,7	2200 ±437,8	-	205 ±39,7	2200±437 ,8
TA102 (-S9)	-	631±16 3,6	3072±2 37,6	⁸ NR	NR	NR	NR	NR	NR
TA102 (+S9)	-	642±74 ,3	1105±9 2,6	NR	NR	NR	NR	NR	NR
⁹Citotoxicidade (-S9)	+			-			-		
Citotoxicidade (+S9)	+			-			-		

¹CN (controle negativo) revertentes/placa: H₂O (200 µL) referente ao efluente bruto e DMSO (5µL) referente aos extratos; ²CP (controle positivo) revertentes/placa : (-S9) TA98 e TA97a 4NQO (0,05µg/placa); TA100 AZS (0,5µg/placa); TA 102 (irradiação da U.V. por 2'), (+S9) TA98, TA97a, TA100 e TA102: 2 AF (1,0 µg/placa); ³(-S9) Ensaios realizados em ausência de metabolização resposta; ⁴(+S9) Ensaios realizados em presença de metabolização; ⁵(-) negativa; ⁶ colônias de revertentes/mL de efluente ou extrato; ⁷ (±) indicativo de mutagênese; ⁸NR: Análise não realizada; ⁹ (+) citotoxicidade positiva – crescimento em meio completo ≤ 60% em relação ao observado no CN.

Os resultados dos testes de mutagenicidade indicaram que compostos inorgânicos, como metais pesados, podem ser responsáveis pela atividade mutagênica detectada, apesar de, entre os metais analisados, apenas o Ni tenha apresentado teores próximos aos definidos em legislação (Tabela 5).

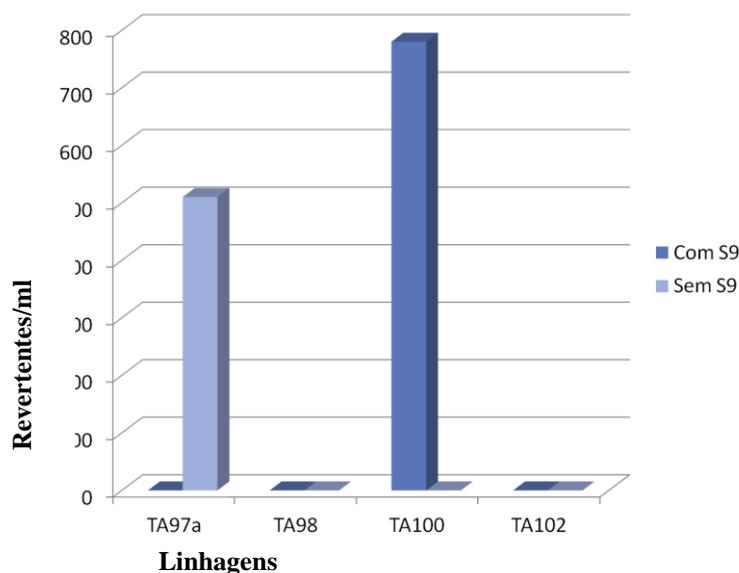


Figura 3 - Número de revertentes/ml para as linhagens testadas frente ao efluente tratado bruto

3.3.1.2 Teste de Ames clássico de acordo com a norma ISO16240/2008

Visando uma alternativa para análise do efluente industrial em sua forma total foi empregado o ensaio clássico de Ames (ISO16240) utilizando uma curva de diluições do efluente final tratado. Esta metodologia tem sido recomendada para utilização na União Européia para análise mais rápida de mutagenicidade de efluentes industriais. Este método seria empregado como uma alternativa para medir a mutagenicidade do efluente total, para análise da presença de substâncias inorgânicas e orgânicas possivelmente presentes na amostra. Na Tabela 14 estão descritos os resultados obtidos frente a esta metodologia.

Tabela 14- Resultados de mutagenicidade para efluente de acordo com o teste clássico de Ames (ISO16240).

Linhagem	CN (H₂O)	¹Critérios	1000 µl	500 µl	250 µl	125 µl	63 µl
TA98 ²(-S9)	19	> 20 rev/placa	³ 10	8	10	13	18
TA98 ⁴(+S9)	17	> 20 rev/placa	14	6	8	14	8
TA97a (-S9)	176	> 80 rev/placa	70	40	20	26	20
TA97a (+S9)	164	> 80 rev/placa	26	14	41	40	43
TA100 (-S9)	99	> 80 rev/placa	8	54	14	5	36
TA100 (+S9)	96	> 80 rev/placa	20	14	18	8	6

¹Critérios para resposta positiva de mutagênese; ²(-S9) Ensaios realizados com metabolização; ³Resultado da subtração da média dos revertentes/placa pela média do controle negativo; ⁴(+S9) Ensaios realizados sem metabolização; CP (controle positivo) revertentes/placa: (-S9) TA98 (404±49,5) e TA97a (346±7,7) 4NQO (0,5µg/placa); TA100 (911±72,1) AZS (5µg/placa); (+S9) TA98 (1256±96,1), TA97a (968±61,5), TA100 (865±32,1) 2 AF (10 µg/placa).

Ao realizar o ensaio clássico de Ames (ISO16240) utilizando uma curva de diluições do efluente final tratado, não foram observadas respostas significativas. Embora esta metodologia tenha sido recomendada para utilização na União Européia no presente estudo esta se mostrou menos sensível que o teste Kado para detecção de danos no material genético.

3.3.2 Análises para avaliar mutagênese e citotoxicidade do solo

Para analisar as amostras em SI e em SR quanto à genotoxicidade e citotoxicidade foram realizados ensaios com extratos orgânicos e ácidos (extração dos compostos inorgânicos) do solo. Foi utilizado o ensaios *Salmonella*/microsoma, método de microsuspenção, frente às linhagens para erro no quadro de leitura (TA98, TA97a) e substituição de pares de bases (TA100), além das linhagens sensíveis a nitroderivados (YG1041 e YG1042) em ausência de metabolização exógena (S9).

Existem evidências de que agentes mutagênicos encontrados no solo podem ser provenientes da biossíntese de compostos agrícolas utilizados no passado, incluindo a aplicação de biocida, adubação e cultivo (EDENHARDER et al., 2000). No entanto, não foram detectados teores acima dos limites de detecção do método sugerindo portanto que os resultados de mutagenicidade encontrados não devem ser atribuídos a pesticidas utilizados no histórico da área (Processo FEPAM nº 0366/2011- DL).

Como observado na Tabela 15 os ensaios para mutagênese realizados com extratos ácidos do solo indicaram respostas significativas em SI com valores em revertentes/mg equivalentes de solo seco, na ordem de $91,6 \pm 31,66$ (+S9) para a linhagem TA97a e um indicativo de mutagenicidade (ANOVA $P < 0,05$) para a linhagem TA100 (+S9) na ausência de citotoxicidade. Além das linhagens básicas, as amostras também foram analisadas frente às linhagens sensíveis aos nitrocompostos nos extratos orgânicos, não sendo observada resposta significativa.

Na fração inorgânica das amostras de solo, os metais pesados foram uma classe de compostos predominantes para a definição de contaminantes prováveis contaminantes mutagênicos de origem antrópica. Esses elementos químicos podem ocorrer em ambientes naturais em baixas concentrações e são essenciais para os seres vivos, mas em quantidades excessivas, podem ser tóxicos, ou poderosos agentes mutagênicos, carcinogênicos e teratogênicos (VARGAS et al, 2001; MONARCA et al, 2002).

Tabela 15 - Resumo dos resultados de mutagenicidade obtidos nas análises de extratos do solo irrigado.

Linhagens	Extrato orgânico do SI	¹ CN	² CP	Extrato ácido do SI	CN	CP
TA98 ³ (-S9)	⁵ -	40±5	406±49,5	-	34,7±2,5	888±5 0,2
TA98 ⁴ (+S9)	-	38±8,5	419±41,7	-	33±4,1	301±1 09,6
TA97a (-S9)	-	248±39,9	1366±182, 6	-	199±33,6	912±1 54
TA97a (+S9)	-	105±81,6	1325,5±81, 3	⁶ 91,6 ±31,7	76±3,2	503±2, 8
TA100 (-S9)	-	149±11,7	1187±53,7	-	254±28,8	1637± 620,8
TA100 (+S9)	-	263±56,1	1959±132, 9	⁷ ±	151±13,2	3256± 126,6
YG 1041 (-S9)	-	132±9,7	300±24,7	⁸ NR	NR	NR
YG 1042 (-S9)	-	256±7	620±24,7	NR	NR	NR
⁹ Citotoxicidade (-S9)	-			-		
Citotoxicidade (+S9)	-			-		

¹CN(controle negativo) revertentes/placa: DMSO(5µL) referente aos extratos; ²CP (controle positivo) revertentes/placa : (-S9) TA98 e TA97a 4NQO(0,05µg/placa); TA100 AZS (0,5µg/placa); TA 102 (irradiação da U.V. por 2'), (+S9) TA98, TA97a, TA100 e TA102: 2 AF (1,0 µg/placa); ³(-S9) Ensaios realizados em ausência de metabolização; resposta; ⁴(+S9) Ensaios realizados em presença de metabolização; ⁵(-) negativa; ⁶ Número de revertentes/mg de solo ou extrato; ⁷(±) indicativa de mutagênese; ⁸NR: Análise não realizada; ⁹(+) citotoxicidade positiva – crescimento em meio completo ≤ 60% em relação ao observado no CN.

A Tabela 16 apresenta resultados de mutagênese referente as linhagens que apresentaram respostas positivas em SI no extrato ácido. Foi possível observar respostas indicativas para as linhagens TA97a e TA100 em ausência e presença de metabolização respectivamente. A citotoxicidade apresentou respostas negativas.

Tabela 16 - Resumo dos resultados de mutagenicidade obtidos nas análises de extratos do solo de referência.

Linhagens	Extrato ácido do SR	CN	CP
TA97a ³ (-S9)	-	79±4	2765±640,6
TA97a ⁴ (+S9)	⁶ ±	76,3±3,2	1508±22
TA100 (-S9)	±	140±2	933±82
TA100 (+S9)	-	151,3±13,3	2414±194,3
⁷ Citotoxicidade (-S9)	-		
Citotoxicidade (+S9)	-		

¹CN (controle negativo) revertentes/placa: DMSO(5µL) referente aos extratos; ²CP (controle positivo) revertentes/placa : (-S9) TA98 e TA97a 4NQO(0,05µg/placa); TA100 AZS (0,5µg/placa); TA102 (irradiação da U.V. por 2'), (+S9) TA98, TA97a, TA100 e TA102: 2 AF (1,0 µg/placa); ³(-S9) Ensaio realizado em ausência de metabolização; resposta; ⁴(+S9) Ensaio realizado em presença de metabolização; ⁵(-) negativa; ⁶(±) indicativa de mutagênese. ⁷Citotoxicidade positiva – crescimento em meio completo ≤ 60% em relação ao observado no CN.

Comparando os resultados de mutagênese observados no efluente e no solo, foi possível verificar a sensibilidade na resposta frente às mesmas linhagens, indicando resultados positivos quando analisados os compostos em sua forma total ou em uma mistura de compostos inorgânicos.

Entre os metais, o Ni se destaca como possível estressor principal da amostra de SI e responsável pela mutagênese observada, uma vez que apresenta esta atividade já relatada em revisão da literatura (WHITE & CLAXTON, 2004) como mutagênico em solo com atividade *in vitro* para bactérias, leveduras, células de plantas ou animais. Ainda apresenta informações suficientes para classificação como carcinogênico do grupo 1, ou seja, como carcinogênico humano (IARC, 2013). Deve ser ressaltado, ainda

que embora as concentrações observadas para os metais tenham sido baixas, alguns, dependendo de sua especiação, como Cr, Ni, Fe e Pb, tem sido associados com atividade mutagênica, principalmente em amostras de solo (SILVA JÚNIOR et al., 2009; POHREN et al., 2012).

Formas de classificação da mutagênese de solo foram empregadas por White & Claxton (2004) e Watanabe et al. (2008), a partir de extratos orgânicos de solo. Embora as respostas observadas no presente estudo sejam em extratos ácidos, a amostra analisada pode ser classificada como mutagênese esperada em área industrial por White & Claxton e como de alto potencial mutagênico por Watanabe et al. (2008).

4 CONCLUSÃO

A dispersão de efluente final tratado em solos vem sendo adotada como uma alternativa à liberação em recursos hídricos. No entanto, torna-se necessária a regulamentação de legislações específicas visando um descarte seguro. Em relação a liberação em recursos hídricos essas legislações adotam como critérios além de parâmetros físicos e químicos, ensaios ecotoxicológicos, ou mesmo, como no caso do Rio Grande do Sul, a inclusão de testes que identifiquem genotoxicidade (RIO GRANDE DO SUL, 2006b).

Para a relação efluente industrial – solo, além das características físico-químicas, dosagens de compostos orgânicos e inorgânicos de acordo com o histórico da área, a inclusão de testes ecotoxicológicos com organismos terrestres, microorganismos do solo, plantas e animais, devem ser priorizadas. No entanto, organismos que definem danos em Ecotoxicologia aquática também devem ser incluídos, uma vez que o solo receptor, por lixiviação, pode contaminar recursos hídricos adjacentes.

Essas baterias possibilitam definir pelo efeito a presença de estressores que podem acarretar danos ecológicos, com reflexos em saúde humana, mesmo quando os componentes individuais da mistura estejam em concentrações dentro de limites considerados seguros nas legislações ambientais vigentes (TAGLIARI et al, 2004; CARDOZO et al., 2007; VARGAS et al., 2008; TERRA et al., 2009; CORONAS et al., 2009; LEMOS et al., 2012).

A presença de acumulação de metais principalmente nas raízes forneceu subsídios para sua utilização como agente de biorremediação do solo na área de aspersão. No entanto o acúmulo de metais com características carcinogênicas, como Ni e Pb, alertam para o descarte seguro destes vegetais.

A associação de ensaios que medem dano ao material genético e testes que avaliam efeitos ecotoxicológicos agudos e crônicos soma evidências quanto à identificação de classes de substâncias perigosas em misturas complexas. Incluir nas baterias de testes como receptores ecológicos organismos representativos do compartimento ambiental investigado, qualificam o estudo de impacto ambiental realizado.

Os resultados observados no presente estudo indicam que a dispersão do efluente tratado da indústria metal mecânica em longo prazo pode comprometer a qualidade funcional do solo. Portanto, análises contínuas são recomendadas para avaliação deste empreendimento e seus possíveis impactos ambientais, além de um estudo comparativo com outros ramos industriais para fornecer subsídios para reformulação de legislação específica.

REFERÊNCIAS

AL-NAKSHABANDI, G. A.; SAQQAR, M. M.; SHATANAWI, M. R.; FAYYAD, M.; AL-HORANI, H. Some environmental problems associated with the use of treated waste water for irrigation in Jordan. *Agricultural Water Management*, v. 34, n. 1, p. 81-94, 1997.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION; AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION; WATER ENVIRONMENT FEDERATION. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 21 ed. Washington, DC: APHA, 2005.

ANSARI, M.I., MALIK, A. Genotoxicity of agricultural soils in the vicinity of industrial area. *Mutation Research*, Amsterdam, v. 673, p. 124-132, 2009.

APPEL, J. S. L., TERESCOVA, V.; RODRIGUES, V. C. B.; VARGAS, V. M. F. Revisão de literatura sobre preservativos de madeira CCA (arseniato de cobre cromatado) aspectos toxicológicos. *Rev Bras Toxicol*, v. 19, p. 29-43, 2007.

ARAGÃO, M. A.; ARAÚJO, R. P. A. Métodos de ensaios de toxicidade com organismos aquáticos. In: ZAGATO, P. A.; BERTOLETTI, E. *Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações*. São Carlos: Rima; 2006.

ARENZON, A. *Ensaio ecotoxicológicos no monitoramento da qualidade de Águas subterrâneas potencialmente impactadas*. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós -Graduação em Ecologia. Porto Alegre, 2004.

ARENZON, A.; PEREIRA NETO, T. J.; GERBER, W. *Manual sobre toxicidade em efluentes industriais*. Porto Alegre: Senai, 2011.

ARIENZO, M.; CHRISTEN, E. W.; QUAYLE, W.; KUMARC, A. A review of the fate of potassium in the soil–plant system after land application of wastewaters. *Journal of Hazardous Materials*, v. 164, p. 415-422, 2009.

ARORA, M.; KIRAN, B.; RANI, A.; RANI, S.; KAUR, B.; MITTAL, M. Heavy metal Accumulation in vegetables irrigated with water from different sources. *Food Chemistry*, v. 111, p. 811-815, 2008.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT. *NBR 13373: ecotoxicologia Aquática – Toxicidade crônica – Método de Ensaio com Ceriodaphnia spp* (Crustacea, Cladocera). Rio de Janeiro: ABNT, 2005.

_____. *NBR 13373: Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade Crônica – Método de Ensaio com algas (Chlorophyceae)*. Rio de Janeiro: ABNT, 2005.

_____. *NBR 15469: Ecotoxicologia aquática - Preservação e preparo de amostras*. Rio de Janeiro: ABNT, 2007.

_____. *NBR ISO/IEC 17025. Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração*. Rio de Janeiro: ABNT, 2005.

AWASHTHI, SK. *Prevention of Food Adulteration Act no 37 of 1954*. Central and state rules as amended for 1999. 3. ed. New Delhi: Ashoka Law House, 2000.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA. Resolução nº 420, de 28 de dezembro de 2009. Dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas. *Diário oficial da União*, Brasília, DF, n. 249, p.81-84, 30 dez. 2009.

_____. Resolução nº 430, de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA. *Diário oficial da União*, Brasília, DF, n. 92, p. 89, 16 maio 2011.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. *Diário oficial da União*, Brasília, DF, p. 58-63, 18 mar. 2005.

CARIDAD CANCELA, R. *Contenido de macro micronutrientes, metales pesados y otros elementos en suelos naturales de São Paulo (Brasil) y Galicia (España)*. Tesis (Doctorado) - Universidad de La Coruña. La Coruña, 2002.

CLAXTON, L.; HOUK, V. S.; HUGHES, T. J. Genotoxicity of industrial wastes and effluents. *Mutation Research*, Amsterdam, v. 410, p. 237-243, 1998.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL – CETESB. *Dispõe sobre a aprovação dos Valores Orientadores para Solos e Águas Subterrâneas no Estado de São Paulo – 2005, em substituição aos Valores Orientadores de 2001, e dá outras providências*. Decisão de Diretoria Nº 195-2005- E, de 23 de novembro de 2005. São Paulo: CETESB, 2005.

_____. *Relatório de estabelecimento de valores orientadores para solos e águas subterrâneas no Estado de São Paulo*. São Paulo: CETESB, 2001.

CORONAS, M. V; PEREIRA, T. S.; ROCHA, J. A. V.; LEMOS, A. T.; FACHEL, J. M. G.; SALVADORI, D. M. F.; VARGAS, V. M. F. Genetic Biomonitoring of an Urban Population Exposed to Mutagenic Airborne Pollutants. *Environ Int*, v. 35, p. 1023-1029, 2009.

EDENHARDER, R; ORTSEIFEN, M.; KOCH, M.; WESP, H. F. Soil mutagens are airborne mutagens: variation of mutagenic activities induced in *Salmonella typhimurium* TA 98 and TA 100 by organic extracts of agricultural and forest soils in dependence on location and season. *Mutation Research*, v. 472, p. 23-36, 2000.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. *Manual de métodos de análise do solo*. 2. ed. Rio de Janeiro: EMBRAPA CNPS, 1997.

_____. *Métodos de extração de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em amostra de solo, sedimento e lodo*. Jaguariúna: EMBRAPA, 2009.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA.

Procedimentos para coleta de amostras de plantas. 2005. Disponível em: <www.cpatsa.embrapa.br/a_unidade/instalacoes/laboratorios/laboratorio-de-solos/plantas.pdf> Acesso em: set 2012.

_____. *Recomendação de adubação e calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina*. 2. ed. Passo Fundo: SBCS-Núcleo Regional Sul/EMBRAPA-CNPT, 1989.

FANG, F.; WANG, H.; LIN, Y. *Spatial distribution, bioavailability, and health risk assessment of soil Hg in Wuhu urban area, China* Environ. Monit. Assess 179:255–265, 2011. DOI 10.1007/s10661-010-1733-8

FEIGIN, A.; RAVINA, I.; SHALHEVET, J. *Irrigation with treated sewage effluent: management for environmental protection*. Berlin: Springer-Verlag, 1991.

FERNANDEZ, M.; CAGIGAL, E.; VEGA, M. M.; URZELAI, A.; BABIN, M.; PRO, J.; TARAZONA, J. V. Ecological. Ecological risk assessment of contaminated Soils through direct toxicity assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, New York, v. 62, p. 174-184, 2005.

FERREIRA, A. S.; CAMARGO, F. A. O.; TEDESCO, M. J.; BIASSANI, C. A. Alterações de Atributos químicos e biológicos de solo e rendimento de milho e soja pela utilização de resíduos de curtume e carbonífero. *Rev Bras Científica de Solo*, v. 27, p. 755-763, 2003.

FONSECA, A. F. *Disponibilidade de nitrogênio, alterações nas características químicas do solo e do milho pela aplicação de efluente de esgoto tratado*. Piracicaba: ESALQ. 2001.

FRIZZO, T. C. E. *Zoneamento da vegetação e sua relação com metais pesados na mina Volta Grande, Lavras do Sul, RS*. Porto Alegre, 2002.

FUNDAÇÃO ESTADUAL DE PROTEÇÃO AMBIENTAL HENRIQUE LUIZ ROESSLER – RS – FEPAM. *Atlas Ambiental: Estratégias ecotoxicológicas para avaliação de risco aplicado à Bacia Hidrográfica do Rio Caí*. Porto Alegre: FEPAM, 2008.

_____. *Processo FEPAM nº 0366/2011- DL Rio Grande do Sul*. FEPAM. Licença de Operação parte integrante do processo administrativo junto a FEPAM nº 17009-05.67/10-0 para dispersão de efluentes nos solo. Porto Alegre: FEPAM, 2011.

GEIS, S.W.; FLEMING, K.; KORTALS, E.; SEARLE, G.; REYNOLDS, L.; KARNER, D. Modifications to the algal growth inhibition test for use as a regulatory assay. *Environ Toxicol Chem*, v. 19, n. 1, p. 36-41, 2000.

INTERNATION ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION – ISO. *ISO11268-2. Soil Quality - Effects of Pollutants on earthworms (Eisenia fetida) – Part 2: Determination of effects on reproduction*. Geneva: ISO, 1998.

INTERNATION ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION – ISO, *ISO17512-1*. Soil Quality -. Avoidance Test for Determining the Quality of Soils and Effects of Chemicals on Behaviour – Part 1: Test with Earthworms (*Eisenia fetida* and *Eisenia andrei*). Geneva: ISO, 2008.

_____. *Water quality: Determination of the genotoxicity of water and waste water-Salmonella/microsome test (Ames test)*. ISO 16240. Geneva: ISO, 2005.

KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. *Trace elements in soils and plants*. 4. ed. Florida: CRC Press, 1986.

KANSAL, B. D. Effects of domestic and industrial effluents on agricultural productivity. In: DHALIWAL, G. S.; KANSAL, B. D. (Eds.). *Management of Agricultural Pollution in India*. New Delhi: Commonwealth Publishing, 1994.

KIZILOGLU, F. M.; TURAN, M.; SAHIN, U.; KUSLU, Y.; DURSUN, A. Effects of untreated and treated wastewater irrigation on some chemical properties of cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. botrytis) and red cabbage (*Brassica oleracea* L. var. rubra) grown on calcareous soil in Turkey. *Agricultural Water Management*, v. 95, n. 6, p. 716-724, 2008.

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

KOURAA, A; FETHI, F.; LAHLOU, A.; OUAZZANII, N. Reuse of urban wastewater by combined stabilization pond system en Benslimane (Marocco). *Urban Water*, v. 4, p. 373-378, 2002.

LEMOS, A. T.; ROSA, D. P.; ROCHA, J. A. V.; VARGAS, V. M. F. Mutagenicity assessment in a river basin influenced by agricultural, urban and industrial sources. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 72, p. 2058-2065, 2009.

LOPES, C; HERVA, M.; FRANCO-URÍA, A.; ENRIQUE ROCA, E. Multicorrelation models and uptake factors to estimate extractable metal concentrations from soil and metal in plants in pasturelands fertilized with manure. *Environmental Pollution*, v. 166, p. 17-22, 2012.

MACHADO, R. M.; CURIA, A. C.; MONTEGGIA, L. O. Avaliação da toxicidade aguda dos efluentes industriais de uma empresa metal-mecânica utilizando daphnia magna como organismo-teste. IN: CONGRESSO BRASILEIRO DE ECOTOXICOLOGIA, 12., Porto de Galinhas, 2012.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. *Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações*. 2. ed. Piracicaba: Potafos, 1997.

MARON, D. M.; AMES, B. N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Research*, Amsterdam, v. 11, p. 173-215, 2004.

MATSUMOTO, S. T.; MANTOVANI, M. S.; MALAGUTTI, M. I. A.; DIAS, A. L.; FONSECA, I. C.; MARIN-MORALES, M. A. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. *Genetics and Molecular Biology*, v. 29, n. 1, p. 148-158, 2006.

MONARCA, S.; FERETTI, D.; ZERBINI, I.; ALBERTI, A.; ZANI, C.; RESOLA, S.; GELATTI, U.; NARDI, G. Soil contamination detected using bacterial and plant mutagenicity tests and chemical analyses. *Environ Res*, v. 88, p. 64-69, 2002.

OHE, T.; WATANABE, T.; WAKABAYASHI, K. 2004. Mutagens in surface waters: a review. *Mutation Research*, Amsterdam, v. 567, p. 109-149, 2004.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT – OECD. *Earthworm, acute toxicity tests, test guideline 207*. Paris: OECD, 1984.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT – OECD. *Proposal for updating guideline 208*. Terrestrial plant test: seedling emergence and seedling growth test. Draft document. Paris: OECD, 2004.

_____. *Soil Microorganisms: Carbon Transformation Test, test guideline 217*. Paris: OECD, 2000.

_____. *Soil Microorganisms: Nitrogen Transformation Test, test guideline 216*. Paris: OECD, 2000.

PAGANO, A. D.; ZEIGER, E. Conditions for detecting the mutagenicity of divalent metals in *Salmonella typhimurium*. *Environmental and molecular mutagenesis*, New York, v. 19, p. 139-146, 1992.

PAIS, I.; BENTON JONES, J. *The handbook of trace elements*. Boca Raton: Lucie Press, 1997.

PANKRATZ, T. M. *Environmental engineering dictionary and directory*. Boca Raton: Lewis Publishers, 2001.

PICCINI, D. F.; MALAVOLTA, E. Effect of nickel on two common bean cultivars. *Journal of Plant Nutrition*, v. 15, p. 2343-2350, 1992.

POHREN, R. S.; ROCHA, J. A. V. R.; LEAL, K. A.; VARGAS, V. M. F. Soil mutagenicity as a strategy to evaluate environmental and health risks in a contaminated area. *Environment International*, v. 44, p. 40-52, 2012.

RIO GRANDE DO SUL (Estado). Conselho Estadual de Meio Ambiente – CONSEMA. Resolução nº 128. *Diário Oficial do Estado*, Porto Alegre, 07 dez 2006a.

_____. Resolução nº 129. *Diário Oficial do Estado*, Porto Alegre, 24 nov. 2006b.

RODRIGUES, L. H. *Avaliação da sensibilidade de Raphidoceles subcaptata (Chlorococcales. Chlorophyta) ao sulfato de cobre e sulfato de zinco através de testes de toxicidade crônica e determinação da densidade algal por espectrofotometria*. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós Graduação em Ecologia. Porto Alegre, 2002.

SILVA JÚNIOR, F. M. R.; VARGAS, V. M. F. Using the Salmonella assay to delineate the dispersion routes of mutagenic compounds from coal wastes in contaminated soil. *Mutation Research*, Amsterdam, v. 673, p. 116-123, 2009.

UMBUZEIRO, G.; VARGAS, V. M. F. Teste de mutagenicidade com Salmonella typhimurium (Teste de Ames) como indicador de carcinogenicidade em potencial para mamíferos. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Orgs.). *Mutag. Amb.* Canoas: ULBRA, 2003.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – USEPA. *Method 254.7*. Mercury in water by cold Vapor Atomic Fluorescence Spectrometry. Revision 2. Washington, DC: Office of Solid Waste and Emergency Response, 2005.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – USEPA. *Method 3050B*. Acid digestion of sediments, sludges and soil. Revision 2. Washington, DC: Office of Solid Waste and Emergency Response, 1996.

_____. *Method 3550C*. Ultrasonic Extraction. Revision 3. Washington, DC: Office of Solid Waste and Emergency Response, 2007.

_____. *Method 6010C*. Inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry. Revision 3. Washington, DC: Office of Solid Waste and Emergency Response, 2007.

_____. *Method 7471A*. Mercury in solid or semisolid waste (manual cold-vapor technique). Revision 2. Washington, DC: Office of Solid Waste and Emergency Response, 1994.

_____. *Method 8270D*. Semivolatile Organic compounds by Gas Chromatography/mass spectrometry (GC/MS). Revision 4. Washington, DC: Office of Solid Waste and Emergency Response, 2007.

_____. *Soil screening guidance: user's guide*. Publication 9355.4-23. Washington, DC: Office of Solid Waste and Emergency Response, 1996.

VARGAS, V. M. F.; MOTTA, V. E. P.; HENRIQUES, J. A. P. Mutagenic activity detected by the Ames test in river water under the influence of petrochemical industries. *Mutation Research*, Amsterdam, v. 319, p. 31-45, 1993.

WHO/FAO. *Joint FAO/WHO Food Standard Programme Codex Alimentarius Commission 13th Session*. Report of the Thirty Eight Session of the Codex Committee on Food Hygiene. Houston: ALINORM, 2013.

YADAV, A.; YADAV, P. K.; SHUKLA, D. N. Investigation of heavy metal status in soil and vegetables grown in urban area of Allahabad, Uttar Pradesh, India. *International Journal of Scientific and Research Publications*, v. 3, n. 9, 2013.

ZAGATTO, P. A. Ecotoxicologia. In: ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. *Ecotoxicologia aquatica: princípios e aplicações*. São Carlos: Rima; 2006.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho foi realizado com a parceria do Programa de Pós Graduação em Ecologia da UFRGS e da Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luís Roessler – FEPAM, agência de proteção ambiental do Estado do Rio Grande do Sul.

A problemática apontada por esta pesquisa se reveste de importância para os estudos ecológicos, pois tem sua fundamentação teórica na avaliação de risco dos danos potenciais da dispersão de efluente industrial em solo.

Efluentes industriais tem sido um desafio para as empresas que necessitam estar sempre aprimorando as técnicas de tratamento dos resíduos produzidos e para os órgãos ambientais que precisam avaliar constantemente a dispersão destes, diagnosticar, monitorar e fiscalizar tais atividades para evitar impactos ambientais.

A utilização de ensaios ecotoxicológicos associados às análises físicas, químicas e de dano genotóxico é cada vez mais recomendada para este tipo de avaliação. Para o lançamento de efluentes nos recursos hídricos já existem legislações estaduais e nacionais com parâmetros bem específicos definindo não só os teores máximos de cada substância presente no efluente como análises por efeito ecotoxicológico e mutagênico.

As pesquisas utilizando análises para os compartimentos ambientais ar e água são mais abundantes na literatura. As possíveis fontes de contaminação no solo e as estratégias de abordagem para este estudo se constituem num desafio recente. As tendências atuais de análises de risco ecológico, focando o solo, estão dirigidas para a inclusão de testes químicos especializados associados à bioensaios.

Foram realizadas análises físico-químicas incluindo compostos orgânicos e metais pesados em amostras de efluentes e solo nas áreas que receberam efluente tratado (SI) e em área próxima considerada como referência (SR). Foram quantificados ainda metais pesados nas folhas e raízes de *Lolium multiflorum* em SI e SR, além de

folhas de *Eucaliptus grandis* em SI. Ainda foram empregadas análises para medir indução de dano ecotoxicológico e mutagênico a partir das amostras do efluente industrial e do solo.

O potencial risco ecológico de uma área que recebe efluente industrial necessita de uma constante análise de: características físico-químicas; quantificação de compostos orgânicos e inorgânicos de acordo com o histórico da área; inclusão de testes ecotoxicológicos com organismos terrestres, microorganismos do solo, plantas e animais; ensaios com organismos aquáticos, pois o solo pode sofrer processo de lixiviação contaminando recursos hídricos adjacentes e testes de genotoxicidade para garantir a qualidade do ambiente.

Os resultados observados em análises físico-químicas, ecotoxicológicas e genotóxicas de efluentes industriais dispersos no solo do estado do Rio Grande do Sul apresentaram dados que indicaram que a atividade de dispersão do efluente no solo podem em longo prazo ser uma fonte de contaminação para este compartimento ambiental.

A análise química do efluente mostrou que os parâmetros estão em sua maioria dentro dos padrões legais com exceções para P e N totais. Em relação ao solo teores acima da legislação foram encontrados em P, K, Ni e em níveis próximos ao de referência para Hg e Pb. As análises de substâncias orgânicas presentes, tanto no efluente quanto no solo, apresentaram resultados negativos.

Avaliações ecotoxicológicas apresentaram fatores de toxicidade crônica tanto para organismos aquáticos (*C. dúbia* e *P. subcaptata*) como para os organismos terrestres (*Eisenia fetida* e *O. sativa*). Ao avaliar a acumulação de metais nos vegetais foi possível observar elevação de Ni, Zn e Fe, com valores maiores nas raízes em relação às folhas. O tempo limitado de lançamento deste efluente no solo pode ser a justificativa da

resposta negativa referente ao ensaio de fuga de *Eisenia andrei* do solo SI. Nas análises para atividade mutagênica foram detectadas respostas positivas para a linhagem TA100 indicando a mutagênese para efluente após metabolização e indicativas para amostras de solo; ainda foram detectadas respostas significativas para erro no quadro de leitura no efluente (TA97a, em ausência de metabolização) e quanto no solo (em presença de metabolização). Esta se caracteriza, entre as linhagens empregadas, a que apresenta uma maior sensibilidade a danos causados por metais.

A partir dos dados obtidos verifica-se a necessidade de estabelecimento de investigações comparativas com outros ramos industriais avaliando se o processo de disposição de efluente industrial tratado no solo pode comprometer a integridade dos organismos edáficos.

A continuidade do estudo e o incremento de novas pesquisas são necessários visando fornecer subsídios para reformulação nos parâmetros legais que regulamentam a disposição de efluentes, acrescentando a eles testes ecotoxicológicos adequados para a avaliação do impacto da liberação destes no solo.

REFERÊNCIAS

- ALEEM, A.; MALIK, A. Genotoxic hazards of long-term application of wastewater on agricultural soil *Mutation Research*, Amsterdam, n. 538, p. 145-154, 2003.
- AL-NAKSHABANDI, G. A.; SAQQAR, M. M.; SHATANAWI, M. R.; FAYYAD, M.; AL-HORANI, H. Some environmental problems associated with the use of treated waste water for irrigation in Jordan. *Agricultural Water Management*, v. 34, n. 1, p. 81-94, 1997.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION; AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION; WATER ENVIRONMENT FEDERATION. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 21 ed. Washington, DC: APHA, 2005.
- AMES, B. N.; MCCANN, J.; YAMASAKI, E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian microsome mutagenicity test. *Mutation Research*, Amsterdam, n. 31, p. 347-364, 1975.
- ANSARI, M. I.; MALIK, A. Genotoxicity of agricultural soils in the vicinity of industrial area. *Mutation Research*, Amsterdam, v. 673, p. 124-132; 2009.
- APPEL, J. S. L., TERESCOVA, V.; RODRIGUES, V. C. B.; VARGAS, V. M. F. Revisão de literatura sobre preservativos de madeira CCA (arseniato de cobre cromatado) aspectos toxicológicos. *Rev Bras Toxicol*, v. 19, p. 29-43, 2007.
- ARAGÃO, M. A.; ARAÚJO, R. P. A. Métodos de ensaios de toxicidade com organismos aquáticos. In: ZAGATO, P. A.; BERTOLETTI, E. *Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações*. São Carlos: Rima; 2006.
- ARENZON, A. *Ensaio ecotoxicológicos no monitoramento da qualidade de Águas subterrâneas potencialmente impactadas*. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós -Graduação em Ecologia. Porto Alegre, 2004.
- ARIENZO, M.; CHRISTEN, E. W.; QUAYLE, W.; KUMARC, A. A review of the fate of potassium in the soil–plant system after land application of wastewaters. *Journal of Hazardous Materials*, v. 164, p. 415-422, 2009.
- ARORA, M.; KIRAN, B.; RANI, A.; RANI, S.; KAUR, B.; MITTAL, M. Heavy metal Accumulation in vegetables irrigated with water from different sources. *Food Chemistry*, v. 111, p. 811-815, 2008.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT. *NBR 13373: ecotoxicologia Aquática – Toxicidade crônica – Método de Ensaio com Ceriodaphnia spp* (Crustacea, Cladocera). Rio de Janeiro: ABNT, 2005.
- _____. *NBR 13373: Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade Crônica – Método de Ensaio com algas (Chlorophyceae)*. Rio de Janeiro: ABNT, 2005.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT. *NBR 15469: Ecotoxicologia aquática - Preservação e preparo de amostras*. Rio de Janeiro: ABNT, 2007.

_____. *NBR ISO/IEC 17025*. Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro: ABNT, 2005.

AWASHTHI, SK. *Prevention of Food Adulteration Act no 37 of 1954*. Central and state rules as amended for 1999. 3. ed. New Delhi: Ashoka Law House, 2000.

BARRETO, A.; NASCIMENTO, J. J. V. R.; MEDEIROS, E. P.; NÓBREGA, J. A. Changes in chemical attributes of a Fluvent cultivated with castor bean and irrigated with wastewater. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v. 17, n. 5, p. 480-486, 2013.

BERTON, R. S.; PIRES, A. M. M.; ANDRADE, S. A. L.; ABREU, C. A.; AMBROSANO, E. J.; SILVEIRA, A. P. D. Toxicidade do níquel em plantas de feijão e efeitos sobre a microbiota do solo. *Pesq Agropec Bras*, Brasília, DF, v. 41, n. 8, p. 1305-1312, 2006.

BRACK, W. Effect-directed analysis: a promising tool for the identification of organic toxicants in complex mixtures. *Anal Bioanal Chem*, n. 377, p. 397-407, 2003.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA. Resolução nº 20, de 18 de junho de 1986. Estabelece a classificação de águas doces, salobras e salinas. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, p. 11.356, 30 jul. 1986.

_____. Resolução nº 03, de 28 de junho de 1990. Dispõe sobre padrões de qualidade do ar, previstos no PRONAR. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, p. 15937-15939, 22 ago. 1990.

_____. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. *Diário oficial da União*, Brasília, DF, p. 58-63, 18 mar. 2005.

_____. Resolução nº 420, de 28 de dezembro de 2009. Dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas. *Diário oficial da União*, Brasília, DF, n. 249, p.81-84, 30 dez. 2009.

_____. Resolução nº 430, de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA. *Diário oficial da União*, Brasília, DF, n. 92, p. 89, 16 maio 2011.

CABRAL, J. R.; FREITAS, P. S. L.; REZENDE, R.; MUNIZ, A. S.; BERTONHA, A. A. Impacto da água residuária de suinocultura no solo e na produção de capim-elefante. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v. 15, n. 8, p. 823-831, 2011.

CARIDAD CANCELA, R. *Contenido de macro micronutrientes, metales pesados y otros elementos en suelos naturales de São Paulo (Brasil) y Galicia (España)*. Tesis (Doctorado) - Universidad de La Coruña. La Coruña, 2002.

CHEN, G.; WHITE, P. A. The mutagenic hazards of aquatic sediments: a review. *Mutation Research*, Amsterdam, v. 567, p. 151-225, 2004.

CLAXTON, L.; HOUK, V. S.; HUGHES, T. J. Genotoxicity of industrial wastes and effluents. *Mutation Research*, Amsterdam, n. 410, p. 237-243, 1998.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL – CETESB. *Dispõe sobre a aprovação dos Valores Orientadores para Solos e Águas Subterrâneas no Estado de São Paulo – 2005, em substituição aos Valores Orientadores de 2001, e dá outras providências*. Decisão de Diretoria Nº 195-2005- E, de 23 de novembro de 2005. São Paulo: CETESB, 2005.

_____. *Relatório de estabelecimento de valores orientadores para solos e águas subterrâneas no Estado de São Paulo*. São Paulo: CETESB, 2001.

CORONAS, M. V.; PEREIRA, T. S.; ROCHA, J. A. V.; LEMOS, A. T.; FACHEL, J. M. G.; SALVADORI, D. M. F.; VARGAS, V. M. F. Genetic Biomonitoring of an Urban Population Exposed to Mutagenic Airborne Pollutants. *Environ Int*, v. 35, p. 1023-1029, 2009.

COURTY, B.; CURIEUX, F.; MILON, V.; MARZIN, D. Influence of extraction parameters on the mutagenicity of soil samples. *Mutation Research*, Amsterdam, n. 565, p. 23-34, 2004.

DEMARINI, D. Environmental mutagens/complex mixtures. In: LI, A.; HEFLICH, R. (Orgs.). *Genetic toxicology*. Boca Raton: CRC Press, 1991.

DORAN, J. W.; ZEISS, M. R. Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality. *Applied Soil Ecology*, v. 15, p. 3-11, 2000.

DRAGUN, J. *The Soil Chemistry of Hazardous Materials*. Amherst: Amherst Scientific Publishers, 1998.

EDENHARDER, R.; ORTSEIFEN, M.; KOCH, M.; WESP, H. F. Soil mutagens are airborne mutagens: variation of mutagenic activities induced in *Salmonella typhimurium* TA 98 and TA 100 by organic extracts of agricultural and forest soils in dependence on location and season. *Mutation Research*, v. 472, p. 23-36, 2000.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. *Manual de métodos de análise do solo*. 2. ed. Rio de Janeiro: EMBRAPA CNPS, 1997.

_____. *Métodos de extração de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em amostra de solo, sedimento e lodo*. Jaguariúna: EMBRAPA, 2009.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. *Procedimentos para coleta de amostras de plantas*. 2005. Disponível em: <www.cpatsa.embrapa.br/a_unidade/instalacoes/laboratorios/laboratorio-de-solos/plantas.pdf> Acesso em: set 2012.

_____. *Recomendação de adubação e calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina*. 2. ed. Passo Fundo: SBCS-Núcleo Regional Sul/EMBRAPA-CNPT, 1989.

FEIGIN, A.; RAVINA, I.; SHALHEVET, J. *Irrigation with treated sewage effluent: management for environmental protection*. Berlin: Springer-Verlag, 1991.

FERNÁNDEZ, M. D.; CAGIGAL, E.; VEGA, M. M.; URZELAI, A.; BABÍN, M.; PRO, J.; TARAZONA, J. V. Ecological risk assessment of contaminated soils through direct toxicity assessment. *Ecotoxicol Environ Safe*, v. 62, p. 174-184, 2005.

FERREIRA, A. S.; CAMARGO, F. A. O.; TEDESCO, M. J.; BIASSANI, C. A. Alterações de Atributos químicos e biológicos de solo e rendimento de milho e soja pela utilização de resíduos de curtume e carbonífero. *Rev Bras Científica de Solo*, v. 27, p. 755-763, 2003.

FONSECA, A. F. *Disponibilidade de nitrogênio, alterações nas características químicas do solo e do milho pela aplicação de efluente de esgoto tratado*. Piracicaba: ESALQ. 2001.

FRIZZO, T. C. E. *Zoneamento da vegetação e sua relação com metais pesados na mina Volta Grande, Lavras do Sul, RS*. Porto Alegre, 2002.

FUNDAÇÃO ESTADUAL DE PROTEÇÃO AMBIENTAL HENRIQUE LUIZ ROESSLER – RS – FEPAM. *Atlas Ambiental: Estratégias ecotoxicológicas para avaliação de risco aplicado à Bacia Hidrográfica do Rio Caí*. Porto Alegre: FEPAM, 2008.

_____. *Processo FEPAM nº 0366/2011- DL Rio Grande do Sul*. FEPAM. Licença de Operação parte integrante do processo administrativo junto a FEPAM nº 17009-05.67/10-0 para dispersão de efluentes nos solo. Porto Alegre: FEPAM, 2011.

GEIS, S.W.; FLEMING, K.; KORTALS, E.; SEARLE, G.; REYNOLDS, L.; KARNER, D. Modifications to the algal growth inhibition test for use as a regulatory assay. *Environ Toxicol Chem*, v. 19, n. 1, p. 36-41, 2000.

HOLT, M.S. Sources of chemical contaminants and routes into the freshwater environment. *Food Chem Toxicol*, v. 38, p. 21-27, 2000.

HOUK, V.S. The genotoxicity of industrial wastes and effluents - a review. *Mutation Research*, Amsterdam, n. 277, p. 91-138, 1992.

INTERNATION ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION – ISO. *ISO11268-2. Soil Quality - Effects of Pollutants on earthworms (Eisenia fetida) – Part 2: Determination of effects on reproduction*. Geneva: ISO, 1998.

INTERNATION ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION – ISO. *Soil Quality: Avoidance test for Testing the Quality of Soils and Effects of Chemicals on Behaviour. Part 1. Test with Earthworms (Eisenia fetida and Eisenia andrei)*. ISO 17512-1. Geneva: ISO, 2008.

_____. *Water quality: Determination of the genotoxicity of water and waste water-Salmonella/microsome test (Ames test)*. ISO 16240. Geneva: ISO, 2005.

IWEGBUE, C. M. A.; WILLIAMS, E. S.; ISIRIMAH, N. O. Study of heavy metal distribution in soils impacted with crude oil in southern Nigeria. *Soil Sed Contam*, v. 18, p. 136-143, 2009.

JUVONEN, R.; MARTIKAINEN, E.; SCHULTZ, E.; JOUTTI, A.; AHTIAINEN, J.; LEHTOKARI, M. Abattery of toxicity tests as indicators of decontamination in composting oily waste. *Ecotoxicol Environ Saf*, v. 47, p. 156-166, 2000.

KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. *Trace elements in soils and plants*. 4. ed. Florida: CRC Press, 1986.

KADO, N. Y.; LANGLEY, D.; EISENTADT, E. A simple modification of the Salmonella liquid incubation assay: increased sensitivity for detecting mutagens in human urine. *Mutation Research*, Amsterdam, n. 121, p. 25-32, 1983.

KANSAL, B. D. Effects of domestic and industrial effluents on agricultural productivity. In: DHALIWAL, G. S.; KANSAL B. D. (Orgs.). *Management of Agricultural Pollution in India*. New Delhi: Commonwealth Publishing, 1994.

KIZILOGLU, F. M.; TURAN, M.; SAHIN, U.; KUSLU, Y.; DURSUN, A. Effects of untreated and treated wastewater irrigation on some chemical properties of cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. botrytis) and red cabbage (*Brassica oleracea* L. var. rubra) grown on calcareous soil in Turkey. *Agricultural Water Management*, v. 95, n. 6, p. 716-724, 2008.

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

KOUBA, A.; BURIC, M.; KOZÁK, P. Bioaccumulation and Effects of Heavy Metals in Crayfish: A Review. *Water Air Soil Pollut*, v. 211, n. 1-4, p. 5-16, 2010.

KOURAA, A; FETHI, F.; LAHLOU, A.; OUAZZANII, N. Reuse of urban wastewater by combined stabilization pond system en Benslimane (Marocco). *Urban Water*, v. 4, p. 373-378, 2002.

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

- LEME, D. M.; GRUMMT, T.; HEINZE, R.; SEHR, A.; RENZ, S.; REINEL, S.; OLIVEIRA, D. P.; FERRAZ, E. R. A.; MARCHI, M. R. R.; MACHADO, M. C.; ZOCCOLO, G. J.; MARIN-MORALES, M. A. An overview of biodiesel soil pollution: Data based on cytotoxicity and genotoxicity assessments. *Journal of Hazardous Materials*, n. 199-200, p. 343-349, 2000.
- LEMOS, A. T.; ROSA, D. P.; ROCHA, J. A. V.; VARGAS, V. M. F. Mutagenicity assessment in a river basin influenced by agricultural, urban and industrial sources. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 72, p. 2058-2065, 2009.
- LEMOS, C. T.; TERRA, N. R. Poluição causas, efeitos e controle. In: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES J. A. P. (Orgs.). *Genética toxicológica*. Porto Alegre: Alcance, 2003.
- LOPES, C.; HERVA, M.; FRANCO-URÍA, A.; ENRIQUE ROCA, E. Multicorrelation models and uptake factors to estimate extractable metal concentrations from soil and metal in plants in pasturelands fertilized with manure. *Environmental Pollution*, v. 166, p. 17-22, 2012.
- MACHADO, R. M.; CURIA, A. C.; MONTEGGIA, L. O. Avaliação da toxicidade aguda dos efluentes industriais de uma empresa metal-mecânica utilizando daphnia magna como organismo-teste. IN: CONGRESSO BRASILEIRO DE ECOTOXICOLOGIA, 12., Porto de Galinhas, 2012.
- MAGALHÃES, L. C. Estudo do material particulado atmosférico e metais associados às partículas totais em suspensão na cidade de Ouro Preto, MG. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Ouro Preto. Ouro Preto, 2005.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. et al. *Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações*. 2. ed. Piracicaba: Potafos, 1997.
- MARON, D. M.; AMES, B. N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Research*, Amsterdam, v. 11, p. 173-215, 2004.
- MATSUMOTO, S. T.; MANTOVANI, M. S.; MALAGUTTI, M. I. A.; DIAS, A. L.; FONSECA, I. C.; MARIN-MORALES, M. A. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. *Genetics and Molecular Biology*, v. 29, n. 1, p. 148-158, 2006.
- MINAS GERAIS (Estado). Conselho Estadual de Política Ambiental – COPAM. Deliberação Normativa Conjunta nº 01 de 01 de maio de 2008. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. *Diário Oficial do Estado*, 13 maio 2008.
- MONARCA, S.; FERETTI, D.; ZERBINI, I.; ALBERTI, A.; ZANI, C.; RESOLA, S.; GELATTI, U.; NARDI, G. Soil contamination detected using bacterial and plant mutagenicity tests and chemical analyses. *Environ Res*, v. 88, p. 64-69, 2002.

- MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research*, Amsterdam, v. 455, p. 29-60, 2000.
- NAGAJYOTI, P. C.; LEE, K. D.; SREEKANTH, T. M. V. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environ Chem Lett*, v. 8, p. 199-216, 2010.
- NIEMEYER, J. C.; LOLATA, G. B.; CARVALHO, G. M.; DA SILVA, E. M.; SOUSA, J. P.; NOGUEIRA, M. A. Microbial indicators of soil health as tools for ecological risk assessment of a metal contaminated site in Brazil. *Applied Soil Ecology*, v. 59, p. 96-105, 2012.
- OHE, T.; WATANABE, T.; WAKABAYASHIC, K. Mutagens in surface waters: a review. *Mutation Research*, Amsterdam, v. 567, p. 109-149, 2004.
- OLIVEIRA, D. P.; CARNEIRO, P. A.; SAKAGAMI, M. K.; ZANONI, M. V. B.; UMBUZEIRO, G. A. Chemical characterization of a dye processing plant effluent— Identification of the mutagenic components. *Mutation Research*, Amsterdam, n. 626, p. 135-142, 2007.
- ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT – OECD. *Earthworm, acute toxicity tests, test guideline 207*. Paris: OECD, 1984.
- _____. *Proposal for updating guideline 208*. Terrestrial plant test: seedling emergence and seedling growth test. Draft document. Paris: OECD, 2004.
- ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT – OECD. *Soil Microorganisms: Carbon Transformation Test, test guideline 217*. Paris: OECD, 2000.
- _____. *Soil Microorganisms: Nitrogen Transformation Test, test guideline 216*. Paris: OECD, 2000.
- PAGANO, A. D.; ZEIGER, E. Conditions for detecting the mutagenicity of divalent metals in Salmonella typhimurium. *Environmental and molecular mutagenesis*, New York, v. 19, p. 139-146, 1992.
- PAIS, I.; BENTON JOMES, J. *The handbook of trace elements*. Boca Raton: Lucie Press, 1997.
- PANKRATZ, T. M. *Environmental engineering dictionary and directory*. Boca Raton: Lewis Publishers, 2001.
- PARANÁ (Estado). Conselho Estadual de Meio Ambiente – CEMA. Resolução 081,2010. Dispõe sobre os critérios e padrões de ecotoxicidade para o controle de efluentes líquidos lançados em águas superficiais no Estado do Paraná. *Diário Oficial do Estado*, 19 out. 2010.

PEREIRA, T. S.; GOTOR, G. N.; BELTRAMI, L. S.; NOLLA, C. G.; ROCHA, J. A. V.; BROTO, F. P.; COMELLAS, L. R.; VARGAS, V. M. F. Salmonella mutagenicity assessment of airborne particulate matter collected from urban areas of Rio Grande do Sul State, Brazil, differing in anthropogenic influences and polycyclic aromatic hydrocarbon levels. *Mutation Research*, Amsterdam, n. 702, p. 78-85, 2010.

PICCINI, D. F.; MALAVOLTA, E. Effect of nickel on two common bean cultivars. *Journal of Plant Nutrition*, v. 15, p. 2343-2350, 1992.

POHREN, R. S.; ROCHA, J. A. V. R.; LEAL, K. A.; VARGAS, V. M. F. Soil mutagenicity as a strategy to evaluate environmental and health risks in a contaminated area. *Environment International*, v. 44, p. 40-52, 2012.

RIBEIRO, L. R.; MARQUES, E. K. A importância da mutagênese ambiental na carcinogênese humana. In: RIBEIRO, L. R. (Org.). *Mutagênese ambiental*. Canoas: Ulbra, 2003.

RIO GRANDE DO SUL (Estado). Conselho Estadual de Meio Ambiente – CONSEMA. Resolução nº 128. *Diário Oficial do Estado*, Porto Alegre, 07 dez. 2006a.

_____. Resolução nº 129. *Diário Oficial do Estado*, Porto Alegre, 24 nov. 2006b.

RODRIGUES, L. H. *Avaliação da sensibilidade de Raphidoceles subcaptata (Chlorococcales. Chlorophyta) ao sulfato de cobre e sulfato de zinco através de testes de toxicidade crônica e determinação da densidade algal por espectrofotometria*. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós Graduação em Ecologia. Porto Alegre, 2002.

RUBINGER, C. F. *Seleção de Métodos Biológicos para Avaliação Toxicologia de Efluentes Industriais*. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós - Graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2009.

SÄAR, J. 2005. *Biotestes para Efluentes Industriais: Ameaça ou Solução?* Relatório de Aplicação UW-018. Disponível em: <<http://www.umwelt-sc.com.br>>. Acesso em: 26 mar. 2013.

SANDRI, D.; MATSURA, E. E.; TESTEZLAF, R. Alteração química do solo irrigado por aspersão e gotejamento subterrâneo e superficial com água residuária. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v. 13, n. 6, p. 755-764, 2009.

SANTA CATARINA (Estado). Fundação do Meio Ambiente de Santa Catarina – FATMA Portaria Nº 17. Estabelece os Limites Máximos de Toxicidade Aguda para efluentes de diferentes origens e dá outras providências. *Diário Oficial do Estado*, 18 abr. 2002.

SÃO PAULO (Estado). Resolução da Secretaria de Meio Ambiente nº 3. Implementa o controle ecotoxicológico de efluentes líquidos no Estado de São Paulo. *Diário Oficial do Estado*, 23 fev. 2000.

- SCHNOOR, J. L. *Environmental Modeling: Fate and Transport of in Water, Air and Soil*. New York: John Wiley e Sons, 1996.
- SCOTT-FORDSMAND, J. J.; WEEKS, J. M.; HOPKIN, S. P. Importance of contamination history for understanding toxicity of copper to earthworm *Eisenia fetida* (Oligochaeta: Annelida), using the neutralred retention assay. *Environ Toxicol Chem*, v. 19, p. 1774-1780, 2000.
- SILVA JÚNIOR, F. M. R.; VARGAS, V. M. F. Avaliação de Áreas sob a Influência de uma Termelétrica a Carvão através de Ensaio de Genotoxicidade. *J Braz Soc Ecotoxicol*, v. 2, n. 2, p. 197-199, 2007.
- _____. Using the Salmonella assay to delineate the dispersion routes of mutagenic compounds from coal wastes in contaminated soil. *Mutation Research*, Amsterdam, n. 673, p. 116-123, 2009.
- SINGH, A.; CHANDRA, S.; GUPTA, S. K.; CHAUHAN, L. K. S.; RATH, S. K. Mutagenicity of leachates from industrial solid wastes using Salmonella reverse mutation assay. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 66, p. 210-216, 2007.
- STENBERG, B. Monitoring soil quality of arable land: microbiological indicator. *Soil and Plants Science*, v. 49, p. 263-272, 1999.
- TAGLIARI, K. C.; CECCHINI, R.; ROCHA, J. A. V.; VARGAS, V. M. F. Mutagenicity of sediment and biomarkers of oxidative stress in fish from aquatic environments under the influence of tanneries. *Mutation Research*, Amsterdam, n. 561, p. 101-117, 2004.
- TERRA, N. R.; FEIDEN, I. R.; LEMOS, C. T.; OLIVEIRA, N. C. D.; PASTORIZA, T. F.; FACHEL, J. M. G.; VARGAS, V. M. F. Ecotoxicological evaluation in an Effluent and Petrochemical Waste disposal Area. *Water Air soil Pollut*, v. 202, n. 1-4, p. 91-107, 2009.
- TERRA, N. R.; FEIDEN, I. R. Reproduction and survival of *Daphnia magna* Straus, 1820 (Crustacea: Cladocera) under different hardness conditions. *Acta Limnologia Brasiliensia*, v. 15, p. 51-55, 2003.
- TSALEV, D.L., ZAPRIANOV, Z.K. Anatomic absorption spectrometry in occupational and environmental health practice. CRC, Boca Raton FL., USA. V. 1, 1993.
- UMBUZEIRO, G.; VARGAS, V. M. F. Teste de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium* (Teste de Ames) como indicador de carcinogenicidade em potencial para mamíferos. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Orgs.). *Mutag Amb*. Canoas: ULBRA, 2003.
- UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – USEPA. *Method 254.7. Mercury in water by cold Vapor Atomic Fluorescence Spectrometry. Revision 2*. Washington, DC: Office of Solid Waste and Emergency Response, 2005.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – USEPA. *Method 3050B*. Acid digestion of sediments, sludges and soil. Revision 2. Washington, DC: Office of Solid Waste and Emergency Response, 1996.

_____. *Method 3550C*. Ultrasonic Extraction. Revision 3. Washington, DC: Office of Solid Waste and Emergency Response, 2007.

_____. *Method 6010C*. Inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry. Revision 3. Washington, DC: Office of Solid Waste and Emergency Response, 2007.

_____. *Method 7471A*. Mercury in solid or semisolid waste (manual cold-vapor technique). Revision 2. Washington, DC: Office of Solid Waste and Emergency Response, 1994.

_____. *Method 8270D*. Semivolatile Organic compounds by Gas Chromatography/mass spectrometry (GC/MS). Revision 4. Washington, DC: Office of Solid Waste and Emergency Response, 2007.

_____. *Soil screening guidance: user's guide*. Publication 9355.4-23. Washington, DC: Office of Solid Waste and Emergency Response, 1996.

VARGAS, V. M. F.; MIGLIAVACA, S. M. B.; HORN, R. C.; TERRA, N. R. Comparative temporal ecotoxicological study in a river basin influenced by petrochemical industries. *Sci Total Environ*, v. 392, p. 79-92, 2008.

VARGAS, V. M. F.; MIGLIAVACCA, S. B.; MELO, A. C.; HORN, R. C.; GUIDOBONO, R. R.; FERREIRA, I. C. F. S.; PESTANA, M. H. D. Genotoxicity assessment in aquatic environments under the influence of heavy metals and organic contaminants. *Mutation Research*, Amsterdam, v. 490, p. 141-158, 2001.

VARGAS, V. M. F.; GUIDOBONO, R. R.; JORDÃO, C.; HENRIQUES, J. A. P. Use of two short-term tests to evaluate the genotoxicity of river water treated with different concentration/extraction procedures. *Mutation Research*, Amsterdam, v. 343, p. 31-52, 1995.

VARGAS, V. M. F. Mutagenic activity as a parameter to assess ambient air quality for protection of the environmental and human health. *Mutation Research*, Amsterdam, v. 544, p. 313-319, 2003.

VARGAS, V. M. F.; MOTTA, V. E. P.; HENRIQUES, J. A. P. Mutagenic activity detected by the Ames test in river water under the influence of petrochemical industries. *Mutation Research*, Amsterdam, v. 319, p. 31-45, 1993.

WATANABLE, T., HIRAYAMA, T. Genotoxicity of soil. *Journal of Health Science*, 47 (5) 433-438, 2001.

WHITE, P. A.; CLAXTON, L. Mutagens in contaminated soil: a review. *Mutation Research*, Amsterdam, n. 567, p. 227-345, 2004.

WHO/FAO. *Joint FAO/WHO Food Standard Programme Codex Alimentarius Commission 13th Session. Report of the Thirty Eight Session of the Codex Committee on Food Hygiene*. Houston: ALINORM, 2013.

WILLIAMS, T. D.; HUTCHINSON, T. H.; ROBERTS, G. C.; COLEMAN, C. A. The assessment of industrial effluent toxicity using aquatic microorganisms, invertebrates and fish. *The Science of the Total Environment*, v. 134, p. 1129-1141, 1993.

WINEGARDNER, D. *An Introduction to Soils for Environmental Professionals*. Boca Raton: CRC Press LLC, 1995.

YADAV, A.; YADAV, P. K.; SHUKLA, D. N. Investigation of heavy metal status in soil and vegetables grown in urban area of Allahabad, Uttar Pradesh, India. *International Journal of Scientific and Research Publications*, v. 3, n. 9, 2013.

ZAGATTO, P. A. Ecotoxicologia. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. *Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações*. São Carlos: Rima, 2006.

ANEXO A – Valores dos parâmetros físico-químicos do efluente tratado durante o ano de 2011 em coletas trimestrais, Licença de operação nº 0036/2011-DL.

Parâmetros do efluente	Unidade	LD	07/06/2011	02/09/2011	04/11/2011
profundidade da coleta	m				
temperatura da água	°C				
temperatura do ar	°C				
Vazão	m3/dia				
Carbono Orgânico Total	mg/l	0,02	2,5	7,0	16,5
pH (a 20°C)		1 a 13	7,07	7,0	7,00
Nitrogênio Amoniacal	mg/l	0,1	< 0,1	0,25	0,60
Nitrogênio Total Kjedahl	mg/l	0,1	7,0	3,3	1,70
Nitrato (como N)	mg/l	0,3	46,0	28,0	50,0
Nitrito (como N)	mg/l	0,01	0,03	< 0,01	0,01
Sulfato	mg/l	1	502	462	431
Cloreto	mg Cl-/l	1	470	466	301
Dureza	mg/l	5	754	663	421
Demanda química de oxigênio	mg DQO/l	4			
Sólidos sedimentáveis	ml/l	0,1			
Sólido suspensos totais	mg SST/l	1			
Óleo e graxas minerais	mg OG/l				
Condutividade	µS/cm		4460	2472	2077
Fósforo Total	mg/l	0,01	4,7	3,6	2,0
Potássio	mg/l	25	251	290	142
Cálcio	mg/l	25	297	202	180
Magnésio	mg/l	0,5	3,4	2,7	3,7
Alumínio	mg/l	0,01	< 0,01	0,036	0,036
Arsênio	mg/l	0,01			
Bário	mg/l	0,01			
Boro	mg/l	0,01	0,085	0,413	< 0,01
Cádmio	mg/l	0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Cádmio	mg/l	0,001			
Chumbo	mg/l	0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01
Cobre	mg/l	0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005
Cromo	mg/l	0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01
Estanho	mg/l	0,01			
Ferro	mg/l	0,01	< 0,01	0,031	0,017
Lítio	mg/l	0,01			
Manganês	mg/l	0,01	0,694	0,438	0,511
Mercúrio	mg/l	0,000075			
Molibdênio	mg/l	0,01			
Níquel	mg/l	0,01			
Prata	mg/l	0,01			
Selênio	mg/l	0,008			
Sódio	mg/l	25	206	209	207
Vanádio	mg/l	0,01			
Zinco	mg/l	0,01	0,374	0,49	0,435

**ANEXO B – Análise qualitativa dos compostos orgânicos presentes no efluente
disperso no solo**

Parâmetro dos componentes orgânicos do efluente	Unidade	Resultado	Método	Limite de detecção
1,1 - Dicloroetano	ug/l	n.d.	USEPA 8260-b	5
1,1 - Dicloroeteno	mg/l	n.d.	USEPA 8260-b	0,001
1,1 - Dicloropropeno	ug/l	n.d.	USEPA 8260-b	5
1,1,1 - Tricloroetano	ug/l	n.d.	USEPA 8260-b	5
1,1,1,2 - Tetracloroetano	ug/l	n.d.	USEPA 8260-b	5
1,1,2,2 - Tetracloroetano	ug/l	n.d.	USEPA 8260-b	5
1,1,2 - Tricloroetano	ug/l	n.d.	USEPA 8260-b	5
1,2 - Dibromo - 3 – Cloropropano	ug/l	n.d.	USEPA 8260-b	5
1,2 - Dibromoetano	ug/l	n.d.	USEPA 8260-b	5
1,2 - Diclorobenzeno	ug/l	n.d.	USEPA 8260-b	5
1,2 - Dicloroeteno	ug/l	n.d.	USEPA 8260-b	5
1,2 - Dicloropropeno	ug/l	n.d.	USEPA 8260-b	5
1,2 - Dicloroetano	ug/l	n.d.	USEPA 8260-b	0,001
1,2,3 - Triclorobenzeno	ug/l	n.d.	USEPA 8260-b	5
1,2,3 - Tricloropropeno	ug/l	n.d.	USEPA 8260-b	5
1,2,3,4 - Tetraclorobenzeno	ug/l	n.d.	USEPA 8260-b	5
1,2,3,5 - Tetraclorobenzeno	ug/l	n.d.	USEPA 8260-b	5
1,2,4 - Triclorobenzeno	ug/l	n.d.	USEPA 8260-b	5
1,2,4 - Trimetilbenzeno	ug/l	n.d.	USEPA 8260-b	5
1,2,4,5 - Tetraclorobenzeno	ug/l	n.d.	USEPA 8260-b	5
1,3 - Diclorobenzeno	ug/l	n.d.	USEPA 8260-b	5
1,3 - Dicloropropeno	ug/l	n.d.	USEPA 8260-b	5
1,3,5 - Trimetilbenzeno	ug/l	n.d.	USEPA 8260-b	5
1,3,5 - Triclorobenzeno	ug/l	n.d.	USEPA 8260-b	5
1,4 - Diclorobenzeno	ug/l	n.d.	USEPA 8260-b	5
2 - Clorotolueno	ug/l	n.d.	USEPA 8260-b	5
2,2 - Dicloropropeno	ug/l	n.d.	USEPA 8260-b	5
4 - Clorotolueno	ug/l	n.d.	USEPA 8260-b	5
Benzeno	ug/l	n.d.	USEPA 8015 D [PNT003-IN]	0,44
Brometo de metila	ug/l	n.d.	USEPA 8260-b	5
Bromobenzeno	ug/l	n.d.	USEPA 8260-b	5
Bromoclorometano	ug/l	n.d.	USEPA 8260-b	5
Bromodiclorometano	ug/l	n.d.	USEPA 8260-b	5
Bromofórmio	ug/l	n.d.	USEPA 8260-b	5
cis 1,2 - Dicloroeteno	ug/l	n.d.	USEPA 8260-b	5
cis 1,3 - Dicloropropeno	ug/l	n.d.	USEPA 8260-b	5
Cloreto de metila	ug/l	n.d.	-	5
Cloroetano	ug/l	n.d.	USEPA 8260-b	5
Clorofórmio	ug/l	n.d.	USEPA 8260-b	5
Dibromoclorometano	ug/l	n.d.	USEPA 8260-b	5
Dibromometano	ug/l	n.d.	USEPA 8260-b	5
Diclorodifluormetano	ug/l	n.d.	USEPA 8260-b	5

Parâmetro do componente orgânico do efluente	Unidade	Resultado	Método	Limite de detecção
Diclorometano	mg/l	n.d.	USEPA 8260-b	0,001
Estireno	mg/l	n.d.	USEPA 8015 D [PNT003-IN]	0,001
Etilbenzeno	ug/l	n.d.	USEPA 8260-b	0,42000
Hexaclorobutadieno	ug/l	n.d.	USEPA 8260-b	5
Isopropilbenzeno	ug/l	n.d.	USEPA 8260-b	5
1,3 - Dicloropropeno (cis + trans)	ug/l	n.d.	USEPA 8260-b	5
n - Butilbenzeno	ug/l	n.d.	USEPA 8260-b	5
n - Propilbenzeno	ug/l	n.d.	USEPA 8260-b	5
p - Isopropiltolueno	ug/l	n.d.	USEPA 8260-b	5
sec - Butilbenzeno	ug/l	n.d.	USEPA 8260-b	5
terc - Butilbenzeno	ug/l	n.d.	USEPA 8260-b	5
Tetracloroeto de Carbono	mg/l	n.d.	USEPA 8260-b	0,001
Tetracloroeteno	mg/l	n.d.	USEPA 8260-b	0,001
Tolueno	ug/l	n.d.	USEPA 8015 D [PNT003-IN]	0,4300
Trans 1,2 - Dicloroeteno	ug/l	n.d.	USEPA 8260-b	5
Trans 1,3 - Dicloropropeno	ug/l	n.d.	USEPA 8260-b	5
Tricloroeteno	mg/l	n.d.	USEPA 8260-b	0,001
Triclorofluormetano	ug/l	n.d.	USEPA 8260-b	5
Xileno (m,p,o)	ug/l	n.d.	USEPA 8015 D [PNT003-IN]	1

ND = não detectados

ANEXO C – Análise dos 16 HPAs prioritários presentes no efluente

Parâmetro	Unidade	Resultado	Método	Limite de detecção
Acenaftaleno	ug/l	n.d.	USEPA8270-d	0,9935
Acenafteno	ug/l	n.d.	USEPA8270-d	0,991
Antraceno	ug/l	n.d.	USEPA8270-d	0,997
Benzo (a) antraceno	ug/l	n.d.	USEPA8270-d	0,997
Benzo (a) Pireno	ug/l	n.d.	USEPA8270-d	0,998
Benzo (b) Fluoranteno	ug/l	n.d.	USEPA8270-d	1,0
Benzo (g,h,i) Pirileno	ug/l	n.d.	USEPA8270-d	1,0
Benzo (k) Fluoranteno	ug/l	n.d.	USEPA8270-d	0,995
Criseno	ug/l	n.d.	USEPA8270-d	1,0
Dibenzo (a,h) Antraceno	ug/l	n.d.	USEPA8270-d	0,99
Fenantreno	ug/l	n.d.	EPA8270-d	0,995
Fluoranteno	ug/l	n.d.	EPA8270-d	1,0
Fluoreno	ug/l	n.d.	EPA8270-d	1,0
Indeno (1,2,3,c,d) Pireno	ug/l	n.d.	EPA8270-d	0,997
Naftaleno	ug/l	n.d.	EPA8270-d	0,99
Pireno	ug/l	n.d.	EPA8270-d	1,0

ND = não detectados

ANEXO D – Análises quantitativas de agrotóxicos no solo

Parâmetro	Resultado	Unidade	Metodologia	LOQ
Ditiocarbamatos em CS2	ND	ug/kg	POP 05.155	1,0
Glifosato + Ampa	ND	ug/kg	POP 05.184 - LC-MS/MS	36
Glufosinato de amônia	ND	ug/kg	POP 05.184 - LC-MS/MS	36
Ácidos Clorados (fenoxiacéticos)				
2,4 – D	ND	ug/kg	POP 05.108 - LC-MS/MS	0,1
2,4,5 - T – solo	ND	ug/kg	POP 05.108 - LC-MS/MS	10
Bentazona	ND	ug/kg	EPA 8270D	0,1
Dicamba	ND	ug/kg	LC-MS/MS	10
Carbamatos				
3 - Hidroxi carbofurano	ND	mg/kg	EPA 8270D	11
Aldicarbe	ND	mg/kg	EPA 8270D	11
Aldicarbe sulfona	ND	mg/kg	EPA 8270D	11
Carbaril	ND	ug/kg	LC-MS/MS	0,1
Carbofurano	ND	ug/kg	LC-MS/MS	1,0
Carbosulfano	ND	mg/kg	EPA 8270D	11
Etiofencarbe sulfona	ND	mg/kg	EPA 8270D	11
Furatiocarbe	ND	mg/kg	EPA 8270D	11
Iprovalicarbe	ND	mg/kg	EPA 8270D	11
Metiocarb	ND	mg/kg	EPA 8270D	11
Metomil	ND	mg/kg	EPA 8270D	11
Oxadixil	ND	mg/kg	EPA 8270D	11
Pirimicarbe	ND	mg/kg	EPA 8270D	11
Propoxur	ND	mg/kg	EPA 8270D	11
Compostos Organoclorados				
4,4 – DDD	ND	ug/kg	EPA 8081B	0,01
4,4 – DDE	ND	ug/kg	EPA 8081B	0,01
4,4 – DDT	ND	ug/kg	EPA 8081B	0,01
Aldrin	ND	ug/kg	EPA 8081B	0,01
BHC (alfa)	ND	ug/kg	EPA 8081B	0,01
BHC (beta)	ND	ug/kg	EPA 8081B	0,01
BHC (delta)	ND	ug/kg	EPA 8081B	0,01
BHC (gama) - lindano	ND	ug/kg	EPA 8081B	0,01
Clordanos (cis + trans)	ND	ug/kg	EPA 8081B	0,01
Dieldrin	ND	ug/kg	EPA 8081B	0,01
Endossulfan (alfa)	ND	ug/kg	EPA 8081B	0,01
Endossulfan (beta)	ND	ug/kg	EPA 8081B	0,01
Endossulfan sulfato	ND	ug/kg	EPA 8081B	0,01
Parâmetro	Resultado	Unidade	Metodologia	LOQ
Compostos Organoclorados				
Endrin	ND	ug/kg	EPA 8081B	0,01
Endrin aldeído	ND	ug/kg	EPA 8081B	0,01
Endrin cetona	ND	ug/kg	EPA 8081B	0,01
Heptacloro	ND	ug/kg	EPA 8081B	0,01
Heptacloro epóxido	ND	ug/kg	EPA 8081B	0,01

Metoxicloro	ND	ug/kg	EPA 8081B	0,01
Compostos Organofosforados				
Azinfós-etílico	ND	ug/kg	EPA 8270D	0,1
Azinfós-metílico	ND	ug/kg	EPA 8270D	0,70
Clorfenvinfós	ND	ug/kg	EPA 8270D	0,1
Clorpirifós	ND	ug/kg	EPA 8270D	0,1
Clorpirifós metílico	ND	ug/kg	EPA 8270D	0,1
Diazinona	ND	ug/kg	EPA 8270D	0,5
Diclorvós	ND	ug/kg	EPA 8270D	0,1
Dimetoato	ND	ug/kg	EPA 8270D	0,5
Etion	ND	ug/kg	EPA 8270D	0,1
Etrinifós	ND	ug/kg	EPA 8270D	0,1
Fenamifós	ND	ug/kg	EPA 8270D	0,1
Fention	ND	ug/kg	EPA 8270D	0,1
Fentoato	ND	ug/kg	EPA 8270D	0,1
Forato	ND	ug/kg	EPA 8270D	0,1
Forato	ND	ug/kg	EPA 8270D	0,1
Malation	ND	ug/kg	EPA 8270D	0,1
Metidation	ND	ug/kg	EPA 8270D	0,1

ND = não detectado

Análises de toxicidade:

Ensaio de toxicidade para plântulas

Foram utilizados os seguintes organismos teste: *Oryza sativa* (arroz), *Raphanus sativus* (rabanete) e *Lactuca sativa* (alface).

As sementes foram expostas à amostra durante um total de 18 dias, sendo que 50% das sementes germinaram após quatro dias. Na exposição, inicialmente utilizaram-se placas de petry para germinação das sementes, onde a água bideionizada reconstituída e a amostra de efluente foram fornecidas através de algodão embebido nas mesmas, no controle e na amostra, respectivamente.

Após a emergência das sementes, as mesmas foram cuidadosamente transferidas para sementeiras comerciais, que permaneceram em aquários contendo uma fina camada de água bideionizada reconstituída (controle) e amostra do efluente, a fim de possibilitar o fornecimento uniforme de água para o crescimento das plântulas, por um período de 14 dias. A areia fina utilizada como substrato foi lavada com uma solução de ácido nítrico 0,1N e abundantemente enxaguada antes do ensaio. O ensaio foi realizado com cinco réplicas para cada espécie de planta, sendo mantidas em sala com a temperatura controlada em $25 \pm 1^\circ \text{C}$ e umidade constante durante o período de crescimento, devido à percolação no substrato.

ANEXO F: Tabela comparativa entre o crescimento das plântulas com adição de água deionizada (controle) e efluente tratado.

Crescimento da alface

	Controle (valores médios)			Alface (valores médios)		
	Nº de folhas	Caule (cm)	Raiz (cm)	Nº de folhas	Caule (cm)	Raiz (cm)
Réplica 1	2,0	1,0	2,3	2,0	0,8	1,9
Réplica 2	2,0	1,2	1,5	2,0	1,1	1,9
Réplica 3	2,0	1,0	1,2	2,0	1,0	2,6
Réplica 4	2,0	0,9	1,2	2,0	1,0	2,2
Réplica 5	2,0	0,9	0,9	2,0	0,9	2,4
Total	2,0	1,0	1,4	2,0	1,0	2,2
Réplica 5	1,8	0,9	3,2	2,0	5,3	1,6
Total	2,0	1,0	3,3	1,96	4,1	2,6

Crescimento do rabanete

	Controle (valores médios)			Rabanete (valores médios)		
	Nº de folhas	Caule (cm)	Raiz (cm)	Nº de folhas	Caule (cm)	Raiz (cm)
Réplica 1	2,4	1,1	4,6	2,0	3,1	2,9
Réplica 2	1,8	1,0	3,1	2,0	4,0	2,3
Réplica 3	1,8	1,5	3,4	2,0	3,3	3,3
Réplica 4	2,2	0,9	2,4	1,8	4,9	3,0
Réplica 5	1,8	0,9	3,2	2,0	5,3	1,6
Total	2,0	1,0	3,3	1,96	4,1	2,6

Crescimento do arroz

	Controle (valores médios)			Arroz (valores médios)		
	Nº de folhas	Caule (cm)	Raiz (cm)	Nº de folhas	Caule (cm)	Raiz (cm)
Réplica 1	3,4	15,9	6,2	2,0	9,3	4,6
Réplica 2	2,8	17,0	6,1	2,2	13,0	6,8
Réplica 3	2,8	13,8	5,0	1,8	9,8	6,2
Réplica 4	2,6	17,0	6,7	1,6	8,7	4,7
Réplica 5	3,4	16,2	6,6	2,2	10,1	4,4
Total	2,99	16,0	6,1	1,96	10,2	5,4

Testes de crescimento dos vegetais

Os testes foram considerados válidos, pois houve o mais de 70% de germinação no controle, sem efeitos fitotóxicos visíveis em todas as sementes e a média de sobrevivência foi superior a 90% das sementes germinadas no controle.

Para avaliação dos resultados foi utilizado o programa estatístico Toxstat versão 3.5 e para as três espécies vegetais os resultados das médias para sementes germinadas com adição da amostra em comparação com o controle foram significativos, não apresentando toxicidade na germinação e não apresentaram toxicidade para o rabanete e para a alface, porém, para o arroz que tem um cultivo que necessita mais de água, quando esta foi substituída por efluente tratado observamos valores abaixo do controle para o número de folhas, crescimento de caule e raiz; sendo portanto considerado tóxica para esta cultura.

Ensaio de toxicidade para microrganismos do solo

Para avaliar os efeitos tóxicos do efluente sobre microrganismos do solo foram medidas as taxas de respiração (ciclo de Carbono) e produção de nitratos (ciclo de nitrogênio).

Os organismos do solo foram expostos à amostra durante 28 dias, sendo utilizado como sistema teste, um solo natural coletado em área livre de aplicação de agroquímicos e fertilizantes (solo da Estação Experimental da UFRGS S30° 06'06", W51° 40'33") e cujas características correspondem a sugerida na referência normativa. Foram preparados dois grupos de teste, com três réplicas para cada. O grupo controle teve a umidade do substrato ajustada para 40% de sua capacidade máxima de retenção de água (CMRA) com água bideionizada, enquanto no grupo teste a umidade foi ajustada com a amostra.

ANEXO G – Taxa de consumo de glicose (μg de glicose/ g de solo – hora)

Ciclo do Carbono

Tratamento	28° dia			Média	Desvio padrão	C V (%)	Diferença percentual (%)	Significância (p=0,05)
	Repl. 1	Repl. 2	Repl. 3					
Controle	109,4	116,8	110,9	112,4	3,90	3,47	6,71	
Amostra	109,0	130,3	122,0	120,4	10,73	8,91	19,52	Não significativa

CV: coeficiente de variação

ANEXO H – Taxa de produção de nitratos (mg NO₃⁻ / kg solo. dia).

Ciclo do Nitrogênio

Tratamento	28° dia			Média	Desvio Padrão	CV (%)	Diferença percentual (%)	Significância (p=0,05)
	Repl. 1	Repl. 2	Repl. 3					
Controle	3,4048	3,1726	4,2440	3,6071	0,5637	15,62611	---	
Amostra	18,0238	17,6667	18,9167	18,2024	0,6438	3,537166	404,62	Significativa – prolongar o ensaio
Tratamento	42° dia			Média	Desvio Padrão	CV (%)	Diferença percentual (%)	Significância (p=0,05)
	Repl. 1	Repl. 2	Repl. 3					
Controle	10,8770	10,1746	12,5794	11,2103	1,2365	11,03045	---	
Amostra	12,3730	12,1349	12,7302	12,4127	0,2996	2,41363	10,73	Não significativa

CV: coeficiente de variação

Para estas análises foi utilizado o programa estatístico Toxstat versão 3.5, onde foi feito um Teste de Turkey, analisando estatisticamente uma comparação múltipla entre médias dos resultados do 28° dia do teste (anexo 7 e 8). No ciclo do nitrogênio foi necessário prolongar o ensaio por mais 14 dias, pois o teste estatístico apresentou diferença percentual acima de 25% no 28° dia. Ao dar continuação ao ensaio esta diferença cai para 10,73% o que o torna não significativo.

ANEXO I – Resultado de toxicidade para o ciclo de carbono e nitrogênio

	Resultado
Toxicidade – ciclo de carbono	Não tóxica após 28 dias
Toxicidade – ciclo do nitrogênio	Não tóxica após 42 dias

Teste de toxicidade aguda para *Eisenia fetida***Material e métodos**

As minhocas foram expostas à amostra durante 14 dias, sendo utilizado como solo um substrato artificial preparado com caulim, turfa e areia. Foram preparados dois grupos de teste, com quatro réplicas para cada. O grupo controle teve a umidade do substrato ajustada para 40% de sua capacidade máxima de retenção de água (CMRA) com água bideionizada, enquanto no grupo teste a umidade foi ajustada com a amostra. Foram inseridos 10 organismos por réplica imediatamente após o ajuste da umidade.

ANEXO J – Análise da mortalidade de *Eisenia fetida* com solo artificial umidificado com água deionizada no controle e efluente tratado na amostra.

Efeitos de letalidade para *Eisenia fetida*

Identificação	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 4	Mortalidade (%)
Controle	0/10	0/10	1/9	0/10	0
Amostra	0/10	0/10	1/9	0/10	0

Não foi observado nenhum efeito de letalidade do efluente tratado para os organismos teste (anexo J).

ANEXO K – Peso dos organismos no início da exposição no ensaio de toxicidade aguda com *Eisenia fétida*.

Avaliação do peso dos organismos

	Controle				Amostra			
	Répl. 1	Répl. 2	Répl. 3	Répl. 4	Répl. 1	Répl. 2	Répl. 3	Répl. 4
Peso médio (mg)	385,5	418,1	427,0	427,7	467,3	421,7	379,8	321,4
Média (mg)	414,6				397,6			

**ANEXO L – Peso dos organismos no final da exposição de toxicidade aguda com
Eisenia fetida.**

	Controle				Amostra			
	Répl. 1	Répl. 2	Répl. 3	Répl. 4	Répl. 1	Répl. 2	Répl. 3	Répl. 4
Peso médio(mg)	428,7	444,6	405,4	460,3	444,3	426,9	349,8	270,8
Média (mg)	434,8				373,0			
Ganho de peso (mg)	4,87				- 6,19			

Os organismos teste tiveram uma perda de peso no solo artificial que recebeu a amostra de efluente tratado, portanto tal amostra é considerada tóxica em relação ao crescimento de organismos do solo (anexos K e L).