

# IMPLANTAÇÃO DO PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DA TOXICIDADE (AIT-USEPA) NO LECOMIN.

**Aline de Araujo Bruno dos Santos**

Aluna de Graduação em Ciências Biológicas 7º período,  
UNIGRANRIO

Período PIBIC/CETEM : julho de 2013 a julho de 2014,  
[aasantos@cetem.gov.br](mailto:aasantos@cetem.gov.br)

**Silvia Gonçalves Egler**

Orientadora, Bióloga, M.Sc.

[segler@cetem.gov.br](mailto:segler@cetem.gov.br)

## 1. INTRODUÇÃO

De acordo com a Norma Brasileira – NBR 9800/1987 (ABNT, 1987), efluente líquido industrial é o despejo líquido proveniente de indústrias. Por muito tempo não existiu a preocupação de caracterizar a geração de efluentes líquidos industriais e de avaliar seus impactos no meio ambiente. No entanto, a legislação vigente e a conscientização ambiental fazem com que algumas indústrias desenvolvam atividades para qualificar a vazão e determinar a composição dos efluentes industriais. Essa avaliação é feita através de ensaios ecotoxicológicos, onde organismos vivos são expostos a uma série de diluições e suas respostas (mortalidade, imobilidade, efeitos reprodutivos etc.) são utilizadas como indicadores de poluição (MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008). Os ensaios ecotoxicológicos podem ser definidos como agudos ou crônicos, dependendo do tipo de resposta observada e da duração de exposição.

Os efluentes são constituídos de misturas e sua toxicidade pode estar relacionada a um ou mais grupos de compostos químicos como metais, amônia, compostos orgânicos, surfactantes, oxidantes, etc. Para isso, foram desenvolvidos os testes de Avaliação e Identificação da Toxicidade - AIT (em inglês *Toxicity Identification and Evaluation* – TIE), que consiste em submeter amostras desconhecidas a uma série de tratamentos físicos e químicos, de modo a reter ou eliminar grupos de compostos tóxicos. Foi desenvolvida inicialmente pela agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA, 1991), para avaliar a toxicidade de efluentes industriais, mas estudos demonstraram que podem também ser utilizada para descobrir a toxicidade em águas superficiais e solubilizados de resíduos perigosos.

## 2. OBJETIVOS

Implantar a Fase I do método de Avaliação e Identificação da Toxicidade no Laboratório de Ecotoxicologia Aplicada à Indústria Mínero-Metalúrgica (LECOMIN) e identificar os possíveis compostos ou classe de compostos causadores da toxicidade em um efluente industrial ou em amostras ambientais.

## 3. METODOLOGIA

Esse projeto foi realizado no Laboratório de Ecotoxicologia Aplicada à Indústria Mínero-Metalúrgica (LECOMIN).

### 3.1 Ensaio de toxicidade aguda

O método consiste na exposição de organismos jovens a várias diluições da amostra onde será observada mortalidade ou imobilidade para determinar a concentração efetiva mediana ( $CE_{50\%}$ ) que representa a concentração que causa efeito agudo a 50% dos organismos-teste. Ensaios de toxicidade aguda com efluentes são realizados utilizando diferentes concentrações (100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25% e 3,12%). A espécie bioindicadora utilizada nestes experimentos foi *Daphnia similis* (Cladocera, Crustacea), cultivadas de acordo com as recomendações da norma da ABNT NBR 12713 (ABNT, 2009). O cultivo desses organismos é realizado em meio MS, sendo a dureza ajustada entre 40 e 48 mg  $CaCO_3/L$ , pH entre 7,0 e 7,6 e oxigênio dissolvido acima de 5 mg.L<sup>-1</sup>. Os organismos são mantidos em incubadora a  $20 \pm 2^\circ C$  e fotoperíodo de 8 horas no escuro e 16 horas de luz. Os ensaios tem duração de 48 horas utilizando organismos-teste em idade de 6 a 24 horas, volume de solução-teste de 25 mL, cinco ou mais diluições mais um controle com meio MS e no mínimo 20 organismos por diluição (quatro replicas com cinco organismos cada). Para o controle da qualidade das culturas mantidas no laboratório foram realizados mensalmente ensaios de sensibilidade com cloreto de sódio (NaCl) como substancia de referência.

### 3.2 Avaliação e Identificação da Toxicidade (AIT)

Dividido em três etapas:

1) Fase I (USEPA, 1991) ou fase de caracterização, onde as amostras são divididas em alíquotas e cada uma destas é submetida a uma manipulação física ou química diferente, de modo a remover, alterar ou tornar biologicamente não disponível determinado grupo de agentes tóxicos (Tabela 1), tais como oxidantes, metais catiônicos, substâncias voláteis, orgânicos não-polares, metais passíveis de quelação e substâncias cuja toxicidade sejam pH dependentes. Informações sobre as características físico-químicas dos agentes tóxicos podem indicar sua filterabilidade, degradabilidade, volatilidade e solubilidade.

A toxicidade é testada por ensaios agudos no efluente sem (ensaio inicial, quando o efluente é recebido, e de referência, concomitante com cada manipulação) e com manipulação (segundo o protocolo). O aumento ou diminuição do efeito toxico é sempre estimado através da comparação entre os resultados dos ensaios de referência e os das manipulações. O ensaio de referência também fornece informação sobre a manutenção ou diminuição temporal da toxicidade da amostra.

Como nesta fase são utilizadas substâncias nas diferentes manipulações, tais como, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), tiossulfato de sódio ( $Na_2S_2O_3$ ) e metanol ( $CH_3OH$ ) (Tabela 1), foram realizados ensaios de toxicidade aguda para a obtenção da  $CE_{50\%48h}$  de cada uma. Este procedimento tem como objetivo a obtenção de uma estimativa da concentração limite de cada substância de modo a evitar interferências na toxicidade final do efluente.

2) Fase II corresponde à fase de identificação, em que as técnicas de fracionamento das amostras são aplicadas em conjunto com análises químicas, voltadas à identificação dos

compostos indicados na Fase I. Os métodos analíticos disponíveis permitem a identificação de orgânicos não-polares, metais quelados por EDTA e amônia. Esta fase não será atingida neste estudo.

3) Fase III ou fase de confirmação destina-se a confirmar a identificação do agente tóxico. Esta fase também não será atingida neste estudo.

**Tabela 1:** Fase I: Manipulações e agentes-alvos, segundo USEPA (1991).

Manipulação	Agente-alvo
- Ajuste do pH inicial para pH 3 e pH 11 <sup>(1)</sup>	- Compostos afetados por mudanças extremas de pH (sulfetos, cianetos)
- Filtração das amostras com pH inicial, 3 e 11, em membrana de fibra de vidro de 1 µm <sup>(1)</sup>	- Sólidos filtráveis ou compostos cuja solubilidade é influenciada por condições ácidas ou alcalinas
- Aeração das amostras com pH inicial, 3 e 11 <sup>(1)</sup>	- Compostos voláteis (solventes orgânicos), oxidáveis (cloro) ou flotáveis (surfactantes)
- Extração cromatográfica em fase sólida – Coluna C <sub>18</sub> - das amostras com pH inicial, 3 e 9 <sup>(1); (2)</sup>	- Compostos orgânicos não polares (solventes, pesticidas, hidrocarbonetos aromáticos polinucleares)
- Eluição da coluna C <sub>18</sub> com metanol 100%	- Exclusão da toxicidade devida a compostos orgânicos não polares
- Adição de EDTA <sup>(3)</sup> a diluições da amostra	- Metais catiônicos (cobre, zinco, níquel e cádmio)
- Adição de Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>(4)</sup> a diluições da amostra	- Oxidantes (cloro, peróxidos), além de certos metais catiônicos (cobre, cádmio e mercúrio)
- Graduação de pH: ajuste do pH para 6; 7 e 8 ou 6,5; 7,5 e 8,5	- Compostos sensíveis a variações do pH dentro da faixa fisiologicamente aceitável (6 a 9), caso de certos metais e amônia

(1) Antes da realização do ensaio de toxicidade, o pH das alíquotas devem ser reajustados para o valor inicial da amostra. (2) A coluna degrada-se em valores de pH superiores a 10, daí o ajuste do pH antes da passagem da amostra pela coluna. (3) EDTA = Ácido etileno diamino tetraético. (4) Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> = Tiosulfato de sódio.

Além dos ensaios com as substâncias citadas na Tabela 1, foram realizadas manipulações com um efluente obtido de processos siderúrgicos. O programa estatístico utilizado para a obtenção das CE<sub>50%,24</sub> ou 48h foi o Trimmed Spearman-Kärber Method.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As CE<sub>50%,48h</sub> das substâncias a serem adicionadas obtidas foram: tiosulfato de sódio - CE<sub>50%</sub> = 0,93 mg/L, com 95% de intervalo de confiança entre 1,09 e 0,80 mg/L; EDTA -

$CE_{50\%} = 134,18$  mg/L, com 95% de intervalo de confiança entre 135,78 e 139,60 mg/L e metanol -  $CE_{50\%} = 1,54$  mL/L, com 95% de intervalo de confiança entre 1,68 e 1,41 mL/L, que serão utilizados posteriormente para a realização dos ensaios na primeira fase do AIT.

Com os ensaios de toxicidade inicial realizados com a amostra de efluente, nas diluições de 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25% e 3,12%, foi obtido o valor de  $CE_{50\%,24h} = 17,32\%$ . Com esta informação foram realizadas algumas manipulações (pH, filtração e aeração) com o objetivo de elaborar um protocolo e tabelas com os procedimentos e informações requeridos na Fase I. Os resultados obtidos com os ensaios de referência demonstraram rápida perda de toxicidade do efluente com o tempo e as manipulações foram suspensas.

A rapidez na realização dos procedimentos desde o 1º dia de recebimento da amostra só será plenamente obtida com a finalização do protocolo e suas respectivas tabelas. Novas amostras só serão testadas após esta finalização.

## 5. CONCLUSÕES

Ficou evidente a importância, da conclusão do protocolo e suas respectivas tabelas para a aplicação do método de AIT no Lecomín, e a realização do ensaio de referência para acompanhamento da toxicidade da amostra testada evitando perda de tempo e esforços.

## 6. AGRADECIMENTOS

À M.Sc Silvia G. Egler, pela orientação durante o período da bolsa de Iniciação Científica e pelos ensinamentos passados, à M.Sc Danielly P. Magalhães pela co-orientação no trabalho, auxílio no laboratório e esclarecimento de dúvidas. Ao CETEM - Centro de Tecnologia Mineral - pela estrutura e equipamentos utilizados e ao CNPq pela bolsa de Iniciação Científica concedida.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS - NBR-9800: **Crériterios para lançamento de efluentes líquidos industriais no sistema coletor público de esgoto sanitário**. Rio de Janeiro, 1987. 6 p.

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS - NBR 12713: **Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda- Métodos de ensaio com *Daphnia* spp (Cladocera, Crustacea)**. Rio de Janeiro, RJ. 2009. 23p

MAGALHÃES, D. P.; FERRÃO FILHO, A. S. A Ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia brasiliensis**. v. 12, n. 3, p. 355- 381. 2008.

USEPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY - EPA/600/6-91/003. **Methods for Aquatic Toxicity Identification Evaluations: Phase I Toxicity Characterization Procedure**. Second Edition. 1991.