



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

VALDELÚCIA MARIA ALVES DE SOUZA GRINEVICIUS

AVALIAÇÃO DA REMEDIAÇÃO DE EFLUENTES DE UMA
INDÚSTRIA TÊXTIL UTILIZANDO BIOINDICADORES
E BIOMARCADORES

Florianópolis

2006

VALDELÚCIA MARIA ALVES DE SOUZA GRINEVICIUS

**AVALIAÇÃO DA REMEDIAÇÃO DE EFLUENTES DE UMA
INDÚSTRIA TÊXTIL UTILIZANDO BIOINDICADORES
E BIOMARCADORES**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia, da Universidade Federal de Santa Catarina,
como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em
Biotecnologia. Área de concentração: Ambiental.**

**Orientadores: Prof^a. Dr^a. Rozangela Curi Pedrosa
Prof. Dr. Valfredo Tadeu de Fávere**

Florianópolis

2006

Grinevicius, Valdelúcia Maria Alves de Souza

Avaliação da remediação de efluentes de uma indústria têxtil utilizando bioindicadores e biomarcadores / Valdelúcia Maria Alves de Souza Grinevicius. Florianópolis, 2006. 161 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

1. Efluente têxtil. 2. Remediação. 3. Quitosana. 4. Testes de toxicidade aguda.
5. Estresse oxidativo. 6. Biomarcadores.

Dedico este trabalho a meu marido Sérgio e ao nosso filho Alexei, que nutrem minha vida com verdadeiro amor, que me inspiram a manter a confiança e o entusiasmo, e que me apoiaram nesta jornada de pesquisa.

AGRADECIMENTOS

Ao Criador, por ter abençoado minha existência com inúmeras oportunidades de aprender mais sobre os fenômenos que permitem a existência da vida e, desta forma, compreender alguns dos mistérios que nos desafiam a entender a mente divina.

Aos meus queridos pais Belmiro e Maria do Carmo e meus amados irmãos Cleide e Roberto que me ensinaram a admirar a natureza e sempre demonstraram como minhas vitórias dependem fundamentalmente da minha honestidade ao enfrentar as dificuldades na vida.

A Prof^ª. Dr^ª. Rozangela Curi Pedrosa e ao Prof. Dr. Valfredo Tadeu de Fávère pela orientação. O valor inestimável da atuação deles garantiu o sucesso desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Danilo Wilhelm Filho do Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Ecologia e Zoologia da UFSC; ao Prof. Dr. Mauro C. M. Laranjeiras do Centro de Ciências Físicas e Matemáticas da UFSC; ao Prof. Dr. Jacir Dal Mazo do Centro de Ciências Agroambientais e de Alimentos da Universidade UNOCHAPECÓ; e à Prof^ª. Dr^ª. Regina Vasconcellos Antônio do Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica da UFSC por todas as sugestões, contribuições e participação na banca examinadora.

A Prof^ª. Dr^ª. Margarida Matos de Mendonça por ter contribuído para o desenvolvimento do projeto de pesquisa como minha tutora, sua presença marcante e idéias estimulantes foram decisivas e conquistaram minha admiração e respeito! Que privilégio conhecê-la!

Ao Prof. Dr. Carlos Henrique Lemos Soares e à amiga Prof^ª. Dr^ª. Ivana Eunice Baptista pelo auxílio nos ensaios com *Daphnia magna*.

Ao Prof. Dr. Jörg Zaar, da Universidade Regional de Blumenau e da Umwelt, pelo auxílio nos ensaios com *Vibrio fischeri*.

À Prof^ª. Dr^ª. Irene Yukiko Kimura do Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá por ter gentilmente cedido as imagens de microscopia eletrônica de varredura das microsferas de quitosana.

Às Prof^{ªs}. Dr^{ªs}. Cândida Leite Kassuya e Alessandra Pellizzaro Bento da Universidade do Oeste Catarinense - UNOESC - Campus Videira, pela paciência, conselhos, recomendações e principalmente pela clareza de idéias, valiosas sugestões e companheirismo em nossas viagens.

Aos amigos do curso de mestrado em Biotecnologia, em especial para Sabrina Moro Villela, Liz Camargo Ribas e Vitor Enumo de Souza por terem me

honrado com suas sugestões de refinada inteligência, exemplos de honestidade, dedicação ao trabalho e amizade genuína. Muito obrigada!

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica Experimental, que contribuíram inúmeras vezes para a execução e o sucesso desta pesquisa, principalmente pela paciência, dedicação e companheirismo. Muito obrigada às alunas da iniciação científica Karina Bettiga e Mariane Magiavachi, os mestrandos Luis Paulo Wiese e Maicon Kwiecinsk, e aos doutorandos Eduardo Antonio Ferreira, Reginaldo Geremias, Silvio Ávila e Tatiana Schoenfelder!

Aos mestres e amigos Karina Carbonari, Jean Benassi e Jussara de Mattos Rebello, pela colaboração em diferentes etapas desta pesquisa e principalmente pelo incentivo e exemplo de dedicação, fé e otimismo.

Aos amigos do Laboratório QUITEC Rogério Laus, Karen, Karina, Alexandre, e Elder que colaboraram nesta pesquisa, com sugestões e principalmente na realização das etapas de seleção da formulação de quitosana e nos ensaios químicos.

Às amigas do Laboratório de Biologia Molecular e Bioquímica de Microrganismos, principalmente às doutorandas Ana Kelly Pitlovanciv e Derce Recouvreux pelo apoio e amizade.

Às minhas amigas Aline Previ, Caroline Rosa, Érika Celestino e Flávia Fernandes de Oliveira por todo apoio logístico e principalmente pelo carinho e amizade sincera.

À Prof^a. Dr^a. Célia Regina Monte Barardi pelo trabalho competente e responsável que desempenhou na gestão anterior da coordenação deste programa, principalmente pelo exemplo de atitude saudável, pelo apoio às questões discentes e pelo trabalho incansável na pesquisa.

Aos Drs. Mário Steindel e Boris Ugarte Stambuk pela competência na condução da coordenação do Programa de Mestrado e Doutorado em Biotecnologia na atual gestão e às secretárias Joice Ferrari da Costa e Lígia Costa por toda a gentileza, atenção e capricho com que trataram todos os alunos do programa.

À indústria têxtil que forneceu os efluentes, especialmente aos engenheiros da gerência de produção e da operação da estação de tratamento de efluentes pelas informações adicionais que foram prontamente oferecidas, quando solicitadas.

E finalmente a CAPES por ter financiado esta pesquisa.

“Pois a terra estará repleta do conhecimento de D’us, como as águas cobrem o leito dos mares. Todos que estão sedentos vão para as águas.” (Yeshayáhu 11:9, 55:1)

RESUMO

Este trabalho apresenta uma avaliação preliminar do potencial da quitosana, na forma pulverizada (QTS3), como um agente remediador de efluente de indústria têxtil. A capacidade de remediação de QTS3 foi avaliada comparativamente à físico-química e biológica convencional (ETE), através de ensaios físico-químicos (redução de cor, pH, condutividade, dureza e teor de metais) e bioensaios com organismos bioindicadores (*Artemia* sp, *Daphnia magna* e *Vibrio fischeri*). Também foram realizados testes de toxicidade subcrônica através da inibição de germinação de sementes, do crescimento de plântulas e de inibição de raízes de bulbos de cebola (*Allium cepa*). Além disto, foram verificados alguns biomarcadores de estresse oxidativo (lipoperoxidação - TBARS, concentração de GSH, atividade da catalase) e de genotoxicidade (fragmentação do DNA e teste de micronúcleos) em peixes (*Danio rerio*). Os resultados obtidos demonstraram que a quitosana removeu aproximadamente 80% dos corantes e reduziu significativamente a condutividade, a dureza e a concentração dos íons de metais existentes no efluente não remediado (EB). Porém, a remediação convencional causou um aumento na concentração de alguns íons de metais. O efluente EB foi altamente tóxico para *V. fischeri* (FD=64), porém os efluentes remediados (ETE e QTS3) não apresentaram toxicidade aguda (FD=1). O efluente QTS3 não causou toxicidade aguda aos microcrustáceos (*Artemia* sp e *D. magna*), enquanto o ETE causou toxicidade apenas à *D. magna* (FD=4). Na verificação da toxicidade subcrônica através da inibição de germinação de sementes e do crescimento de plântulas de *A. cepa*, não foram constatadas diferenças significativas entre os efluentes. Foi observada uma inibição no crescimento das raízes de bulbos expostos ao EB, porém esta foi maior no ETE e o QTS3 causou menor inibição. A remediação com quitosana levou também a uma redução de toxicidade verificada através dos biomarcadores de estresse oxidativo em *D. rerio* que apresentou menores níveis de lipoperoxidação (TBARS=55,06 ± 11,42 nmol.g⁻¹), enquanto os peixes expostos ao ETE apresentaram valores maiores (78,60 ± 4,45 nmol.g⁻¹). Igualmente, com relação à GSH, os animais expostos ao QTS3 (8,34 ± 0,94 µmol.g⁻¹) não apresentaram diferença significativa em relação ao grupo controle (9,17 ± 0,30 µmol.g⁻¹), enquanto os peixes expostos ao ETE (13,70 ± 1,46 µmol.g⁻¹) apresentaram maiores níveis de GSH. Com relação à CAT, novamente os peixes expostos ao QTS3 (118,30 ± 9,30 mmol.min⁻¹.g⁻¹) não apresentaram diferença do grupo controle (103,65 ± 10,76 mmol.min⁻¹.g⁻¹), enquanto os expostos ao EB (45,85 ± 1,90 mmol.min⁻¹.g⁻¹), apresentaram uma atividade diminuída. O QTS3 levou a uma redução da genotoxicidade verificando-se menor dano ao DNA (3,00 ± 0,70) e menor frequência de micronúcleos (0,37 ± 0,12 ‰), comparativamente aos peixes expostos ao efluente ETE, que apresentaram valores maiores para ambos (8,25 ± 1,10 e 0,57 ± 0,08 ‰, respectivamente). Estes resultados permitem concluir que a quitosana pulverizada pode ser utilizada como agente de remediação de efluentes têxteis com vantagens ambientais, comparativamente à remediação efetuada pela empresa que utiliza coagulante inorgânico tóxico. Além de que confirmaram a adequação dos bioindicadores e biomarcadores empregados neste estudo no monitoramento da remediação de efluentes industriais.

Palavras-chave: efluente têxtil, remediação, quitosana, testes de toxicidade aguda, estresse oxidativo, biomarcadores.

ABSTRACT

The present work consists in a preliminary evaluation of a pulverized chitosan (QTS3) as a remediation agent against a textile effluent (EB). The QTS3 remediation capacity was compared to a conventional physico-chemical and biological remediation (ETE), using physico-chemical assay (color reduction, pH, conductivity, hardness, and metal content), assay of acute exposure with different bioindicators (*Vibrio fischeri*, *Artemia* sp, *Daphnia magna*), subchronic exposure using *Allium cepa*, and also biomarkers of oxidative stress and genotoxicity (DNA fragmentation and micronuclei assay) using the fish *Danio rerio* as bioindicator. The results showed that chitosan remediation was able to remove approximately 80% of dyes and also significantly decreased the metal content present in the EB effluent, compared to an increase in metal content found after conventional remediation. The non-remediated effluent (EB) was highly toxic to *V. fischeri* (FD=64), whilst the ETE and QTS3 effluents did not cause acute toxicity using a dilution factor FD=1. Also, the QTS3 effluent did not cause acute toxicity to *Artemia* sp and *D. magna*, whilst the ETE effluents cause to *D. magna* (FD=4). After subchronic exposure to *A. cepa* no differences were observed either in the development seeds or seedlings. However, inhibition of root growth was observed in the onion bulbs (*A. cepa*) after exposure to non-remediated effluent (EB), being higher in relation to ETE compared to QTS3 effluent. Chitosan remediation decreased biomarkers of oxidative stress such as lipoperoxidation (TBARS) ($55.06 \pm 11.42 \text{ nmol.g}^{-1}$) and GSH contents ($8.34 \pm 0.94 \text{ } \mu\text{mol.g}^{-1}$), whilst animals exposed to ETE effluent showed enhanced TBARS values ($78.60 \pm 4.45 \text{ nmol.g}^{-1}$), and also enhanced GSH contents ($13.70 \pm 1.46 \text{ } \mu\text{mol.g}^{-1}$). However, after QTS3 exposure no differences were found for GSH contents in controls ($9.17 \pm 0.30 \text{ } \mu\text{mol.g}^{-1}$). In QTS3 exposure no CAT activity induction was observed ($118.30 \pm 9.30 \text{ mmol.min}^{-1}.\text{g}^{-1}$) compared to controls ($103.65 \pm 10.76 \text{ mmol.min}^{-1}.\text{g}^{-1}$), whilst after EB exposure CAT activity was decreased ($102.70 \pm 4.52 \text{ mmol.min}^{-1}.\text{g}^{-1}$). Accordingly, DNA fragmentation and micronuclei indices were higher after exposure to ETE effluent (8.25 ± 1.10 and $0.57 \pm 0.08 \text{ } \%$, respectively) compared after chitosan remediated exposure (3.00 ± 0.70 and $0.37 \pm 0.12 \text{ } \%$, respectively), and the controls (4.75 ± 1.50 and $0.37 \pm 0.12 \text{ } \%$, respectively). The results indicate that chitosan (QTS3) a useful tool for the remediation of effluents from textile industry, which showed a better efficiency compared to the industrial treatment that use toxic inorganic coagulants.

Keys words: textile effluent, remediation, chitosan, acute test toxicity, oxidative stress, biomarkers.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Etapas do processamento de fibras de algodão em indústria têxtil... **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 2** – Representação das unidades que compõem as estruturas dos corantes reativos. (a) grupo reativo triazina e (b) grupo reativo vinilsulfona 16
- Figura 3** – Principais métodos de tratamento de efluentes coloridos 17
- Figura 4** – Planta de tratamento de efluentes da empresa em estudo 19
- Figura 5** – Exemplo de estrutura química de azo corante, em destaque o grupo azo (-N=N-) 21
- Figura 6** – Síntese de corantes azo e formação de aminas aromáticas após clivagem redutiva química ou enzimática 22
- Figura 7** – Exemplo da redução de um azo corante banido (ácido preto 077) em uma amina carcinogênica (benzidina)..... 23
- Figura 8** – Esquema com equações das reações de neutralização das EROs, nas quais participam as enzimas SOD e CAT 41
- Figura 9** – Estrutura química dos biopolímeros quitina (a) e da quitosana (b) 44
- Figura 10** – Fotomicrografia obtida em microscópio eletrônico de varredura de microsfera de quitosana. (a) morfologia da superfície externa da microsfera (50 X), (b) detalhe da superfície (8000 X) 53
- Figura 11** – Plântulas de *Allium cepa* com 12 dias, apresentando desenvolvimento normal após cultivo em substrato contendo QTS3 a 100%..... 69
- Figura 12** – Plântulas de *A. cepa* com 12 dias, apresentando desenvolvimento anormal após cultivo em substrato contendo dicromato de potássio ($1,75 \text{ mg.L}^{-1}$) em caixa de germinação 69
- Figura 13** – Áreas do cometa que foram mensuradas para determinar a classe do cometa e para o cálculo do índice de dano 78
- Figura 14** – Fotomicrografia de eritrócitos de *Danio rerio* corados pelo método Feulgen-Fast-Green 80
- Figura 15** – Fotomicrografia obtida de partículas de quitosana pulverizada em microscópio de varredura (ampliação 300 X) 84
- Figura 16** – Fotomicrografia obtida de partículas de quitosana pulverizada, para observação de sua morfologia superficial em microscópio eletrônico de varredura (ampliação 600 X) 84

Figura 17 – Índice de lipoperoxidação (TBARS, nmol.g^{-1}) em homogenato de *pool* de *Danio rerio* ($n=6$), expostos à água de torneira aerada (CN), a 20 % do efluente têxtil não remediado (EB20), a 20 % do efluente remediado pela empresa (ETE20) e a 20 % do efluente remediado com quitosana pulverizada (QTS320), durante 7 dias.....98

Figura 18 – Concentração de GSH ($\mu\text{mol.g}^{-1}$) em homogenato de *pool* de *Danio rerio* ($n=6$), expostos à água de torneira aerada (CN), a 20 % do efluente têxtil não remediado (EB20), a 20 % do efluente remediado pela empresa (ETE20) e a 20 % do efluente remediado com quitosana pulverizada (QTS320), durante 7 dias.....99

Figura 19 – Atividade enzimática da catalase (CAT) (expressa em $\text{mmol de H}_2\text{O}_2$ consumido $\text{min.}^{-1}\text{g}^{-1}$) em homogenato de *pool* de *Danio rerio* ($n=6$), expostos à água de torneira aerada (CN), a 20 % do efluente têxtil não remediado (EB20), a 20 % de efluente remediado pela empresa (ETE20) e a 20 % de efluente remediado com quitosana pulverizada (QTS320), durante 7 dias 100

Figura 20 – Índice de dano ao DNA (teste do cometa) em homogenato de *Danio rerio* ($n=6$), expostos à água de torneira aerada (CN), a 20 % do efluente têxtil não remediado (EB20), a 20 % de efluente remediado pela empresa (ETE20) e a 20 % do efluente remediado com quitosana pulverizada (QTS320), durante 2 dias..... 102

Figura 21 – Frequência de micronúcleos em eritrócitos de sangue periférico de *Danio rerio* ($n=6$), expostos à água de torneira aerada (CN), a 20 % do efluente têxtil não remediado (EB20), a 20 % de efluente remediado pela empresa (ETE20) e a 20 % do efluente remediado com quitosana pulverizada (QTS320), durante 2 dias.... 103

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Classificação dos corantes, principais características (estrutura química e solubilidade de corantes), fibras nas quais são aplicados e exemplos de corantes em uso. 13
- Tabela 2** – Relação de corantes que apresentam metais na estrutura molecular. ...26
- Tabela 3** – Ensaio de sensibilidade de bactérias bioluminescentes (*Vibrio fischeri*) expostas a Cr^{6+} (na forma de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), Zn^{2+} (na forma de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), e 3,5-diclorofenol $6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 64
- Tabela 4** – Resumo dos requisitos para o ensaio de toxicidade subcrônica com sementes de *Allium cepa* 67
- Tabela 5** – Pontuação e exemplos de cada classe de cometa visualizada através de coloração com nitrato de prata. Imagens de nucleóides presentes em homogenato de *Danio rerio* (n= 6), expostos à água de torneira aerada (CN), a 20 % do efluente têxtil não remediado (EB20), a 20 % de efluente remediado pela empresa (ETE20) e a 20 % do efluente remediado com quitosana pulverizada (QTS320), durante 2 dias. 77
- Tabela 6** – Imagens de micronúcleos em eritrócitos de sangue periférico de *Danio rerio* (n= 6), expostos à água de torneira aerada (CN), a 20% do efluente têxtil não remediado (EB20), a 20% de efluente remediado pela empresa (ETE20) e a 20% do efluente remediado com quitosana pulverizada (QTS320), durante 2 dias. 81
- Tabela 7** – Leitura de absorvâncias (a 517 nm) e porcentagem de remoção de cor, referentes ao efluente têxtil não remediado (EB); remediado pela empresa (ETE); remediado com microesferas de quitosana (QTS1), com quitosana solubilizada em ácido acético (QTS2) e com quitosana pulverizada (QTS3). 86
- Tabela 8** – Leitura de absorvâncias (a 517 nm) e porcentagem de remoção de cor. Resultados referentes ao efluente têxtil não remediado (EB) e remediado com diferentes formulações de quitosana empregadas: QTS_A (0,1 g); QTS_B (0,2 g); QTS_C (0,3 g); QTS_D (0,4 g); QTS_E (0,5 g) e QTS_F (1,0 g). 86
- Tabela 9** – Valores de pH referentes ao efluente têxtil não remediado (EB); remediado pela empresa (ETE); remediado com microesferas de quitosana (QTS1), com quitosana solubilizada em ácido acético (QTS2) e com quitosana pulverizada (QTS3). 87
- Tabela 10** – Concentração de metais no efluente têxtil não remediado (EB), remediado pela empresa (ETE) e remediado com quitosana pulverizada (QTS3) ... 88
- Tabela 11** – Características físico-químicas (condutividade e dureza) do efluente têxtil não remediado (EB), remediado pela empresa (ETE) e remediado com quitosana pulverizada (QTS3)..... 89

Tabela 12 – Toxicidade aguda para bioindicadores (<i>Artemia</i> sp, n=10 e <i>Daphnia magna</i> , n=10) utilizados na seleção da quitosana. Resultados referentes ao efluente têxtil não remediado (EB); remediado pela empresa (ETE); remediado com microesferas de quitosana (QTS1), quitosana solubilizada em ácido acético (QTS2) e quitosana pulverizada (QTS3).....	90
Tabela 13 – Ensaio de toxicidade aguda com <i>Vibrio fischeri</i> (n= 10 ⁶ UFC), expostas às diferentes diluições do efluente têxtil não remediado (EB), remediado pela empresa (ETE) e remediado com quitosana pulverizada (QTS3).....	91
Tabela 14 – Ensaio de toxicidade aguda com náuplios de <i>Artemia</i> sp (n=10), expostos às diluições de efluente têxtil não remediado (EB), remediado pela empresa (ETE) e remediado com quitosana pulverizada (QTS3).....	92
Tabela 15 – Ensaio de toxicidade aguda empregando juvenis de <i>Daphnia magna</i> (n=10), expostos às diluições do efluente têxtil não remediado (EB), remediado pela empresa (ETE) e remediado com quitosana pulverizada (QTS3).....	93
Tabela 16 – Ensaio de toxicidade subcrônica empregando sementes e plântulas de <i>Allium cepa</i> (n=100), expostas ao efluente têxtil não remediado (EB), ao remediado pela empresa (ETE) e ao remediado com quitosana pulverizada (QTS3).....	95
Tabela 17 – Inibição de crescimento de raízes de bulbos de <i>Allium cepa</i> (n=6), expostos à água mineral (controle negativo), ao dicromato de potássio (1,75 mg/L) (controle positivo), ao efluente têxtil não remediado (EB), ao remediado pela empresa (ETE) e ao remediado com quitosana pulverizada (QTS3), durante 3 dias.	96
Tabela 18 – Ensaio de toxicidade aguda empregando <i>Danio rerio</i> (n=6), expostos à água de torneira aerada (CN) e às diluições de efluente têxtil não remediado (EB), remediado pela empresa (ETE) e remediado com quitosana pulverizada (QTS3), por 48 h	97
Tabela 19 – Frequência de classes de dano ao DNA (teste do cometa) em homogenato de <i>Danio rerio</i> (n=6), expostos à água de torneira aerada (CN), a 20 % do efluente têxtil não remediado (EB20), a 20 % de efluente remediado pela empresa (ETE20) e a 20 % do efluente remediado com quitosana pulverizada (QTS320), durante 2 dias.....	101
Tabela 20 – Concentração máxima de metais permitida para lançamentos em corpos de água doce (Classes I, II e III) e para lançamento de efluentes industriais	113

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
BHT	Hidroxitolueno butilado
CAT	Catalase
CE ₅₀	Concentração efetiva real da amostra que causa efeito agudo a 50 % dos organismos no tempo de exposição.
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTNB	5,5'-ditiobis-2-ácido nitrobenzólico
EB	Efluente têxtil não remediado
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ETE	Efluente têxtil remediado através de tratamento convencional em estação de tratamento de efluentes
FATMA	Fundação do Meio Ambiente de Santa Catarina
FD	Fator de diluição
\overline{GD}	Grau médio de desacetilação (% \overline{GD}) da quitosana
GSH	Glutationa reduzida
GSSH	Glutationa oxidada
GST	Glutationa S-transferase
O ₂ ^{•-}	Radical ânion superóxido
[•] OH	Radical hidroxil
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
QTS1	Efluente têxtil remediado com microesferas de quitosana
QTS2	Efluente têxtil remediado com quitosana solubilizada em ácido acético
QTS3	Efluente têxtil remediado com quitosana pulverizada
TBA	Ácido tiobarbitúrico

TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	v
RESUMO.....	viii
ABSTRACT	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xiv
SUMÁRIO.....	xv
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Indústria têxtil no cenário brasileiro e em Santa Catarina.....	1
1.2 Potencial poluidor/degradador gerado pela indústria têxtil e legislação associada ao controle da poluição.....	2
1.3 Etapas do processo produtivo têxtil e substâncias químicas utilizadas	5
1.3.1 Corantes	9
1.4 Classificação de corantes	11
1.4.1 Corantes reativos	14
1.5 Tratamento de efluentes de uma indústria têxtil	16
1.6 Aspectos dos corantes relacionados à poluição	20
1.6.1 Toxicidade de corantes azo e antraquinona	22
1.7 Bioindicadores utilizados na avaliação de toxicidade de efluentes têxteis	26
1.7.1 <i>Vibrio fischeri</i>	27
1.7.2 <i>Artemia</i> sp	29
1.7.3 <i>Daphnia magna</i>	30
1.7.4 <i>Danio rerio</i>	31
1.7.5 <i>Allium cepa</i>	32
1.8 Biomarcadores no biomonitoramento	33
1.8.1 Teste cometa	35
1.8.2 Teste de micronúcleos	37
1.8.3 Lipoperoxidação de membranas celulares.....	38
1.8.4 Defesas antioxidantes.....	39
1.9 Novas alternativas de remoção de cor de corantes e de efluentes têxteis	41
1.9.1 Uso de polieletrólitos em processos de adsorção.....	43
1.9.1.1 Uso de quitosana em processos de adsorção.....	43
2 OBJETIVOS	47

2.1 Objetivo Geral.....	47
2.2 Objetivos Específicos	47
3 METODOLOGIA.....	48
3.1 Considerações Gerais	48
3.2. Materiais e Equipamentos	48
3.2.1 Reagentes gerais	48
3.2.2 Equipamentos	49
3.3 Coleta das amostras de efluentes	50
3.4 Determinação do grau de desacetilação e morfologia da quitosana, preparação das microesferas, solução de quitosana como agente de coagulação e de quitosana pulverizada	51
3.4.1 Grau de desacetilação e morfologia	51
3.4.2 Preparação das microesferas de quitosana (QTS1)	52
3.4.3 Preparação da solução de quitosana em ácido acético (QTS2)	53
3.4.4 Quitosana pulverizada (QTS3).....	53
3.5 Remediação dos efluentes	54
3.5.1 Etapa 1 – Seleção de formulação de quitosana para remediação de efluente têxtil	54
3.5.1.1 Remediação com microesferas de quitosana (QTS1).....	54
3.5.1.2 Remediação do efluente por coagulação/floculação da quitosana (QTS2)	55
3.5.1.3 Remediação do efluente por adsorção em quitosana pulverizada (QTS3)	56
3.5.2 Análises físico-químicas dos efluentes não remediados e remediados	57
3.5.2.1 Determinação do pH	57
3.5.2.2 Determinação da concentração de metais	57
3.5.2.3 Determinação da condutividade	58
3.5.2.4 Determinação da dureza	58
3.6 Avaliação da toxicidade aguda dos efluentes não remediados, e remediados utilizando organismos bioindicadores	59
3.6.1 Ensaio de toxicidade aguda com <i>Artemia</i> sp	59
3.6.2 Ensaio de toxicidade aguda com <i>Daphnia magna</i>	60
3.7 Remediação e biomonitoramento dos efluentes.....	61
3.7.1 Etapa 2 – Remediação e biomonitoramento do efluente têxtil com a quitosana selecionada (QTS3).....	62
3.7.1.1 Remediação com QTS3	62
3.7.1.2 Biomonitoramento dos efluentes utilizando ensaios de toxicidade aguda	62
3.7.1.2.1 Ensaio de toxicidade aguda com <i>Vibrio fischeri</i>	62
3.7.1.2.2 Ensaio de toxicidade aguda com <i>Artemia</i> sp.....	64
3.7.1.2.3 Ensaio de toxicidade aguda com <i>Daphnia magna</i>	64

3.7.1.2.4 Ensaio de toxicidade aguda com <i>Danio rerio</i> , para determinação da dose de não efeito	65
3.7.1.3 Biomonitoramento dos efluentes utilizando ensaios de toxicidade subcrônica.....	66
3.7.1.3.1 Ensaio de toxicidade subcrônica com <i>Allium cepa</i>	66
a) Teste de inibição de germinação de sementes de <i>Allium cepa</i>	66
b) Ensaio de inibição do crescimento de plântulas de <i>Allium cepa</i>	68
c) Ensaio de inibição do crescimento de raiz de <i>Allium cepa</i>	69
3.7.1.3.2 Ensaios de toxicidade subcrônica com <i>Danio rerio</i>	70
a) Avaliação do dano às membranas celulares através da medida da lipoperoxidação.....	71
b) Glutathiona reduzida (GSH)	73
c) Atividade da enzima catalase (CAT).....	73
3.7.1.4 Biomonitoramento dos efluentes utilizando ensaios de genotoxicidade com <i>Danio rerio</i>	74
a) Avaliação do dano ao DNA (Teste cometa).....	75
b) Avaliação do dano secundário ao DNA (Teste de micronúcleos).....	78
3.8 Análise estatística.....	82
4 RESULTADOS	83
4.1 Caracterização da quitosana, das microesferas de quitosana e da quitosana pulverizada	83
4.1.1 Caracterização da quitosana pela determinação do grau de desacetilação e do diâmetro das microesferas.....	83
4.2 Remediação dos efluentes	85
4.2.1 Etapa 1 – Seleção de formulação de quitosana para remediação de efluente têxtil	85
4.2.1.1 Determinação da porcentagem de remoção de cor dos efluentes	85
4.2.2 Análises físico-químicas dos efluentes não remediados e remediados	87
4.2.2.1 Verificação do pH.....	87
4.2.2.2 Análise de metais	87
4.2.2.3 Determinação da condutividade e dureza	88
4.2.2.4 Avaliação da toxicidade aguda dos efluentes utilizando <i>Artemia</i> sp e <i>Daphnia magna</i>	89
4.2.3. Etapa 2 – Remediação e biomonitoramento do efluente têxtil com a quitosana selecionada (QTS3).....	91
4.2.3.1 Biomonitoramento dos efluentes utilizando ensaios de toxicidade aguda.....	91
4.2.3.1.1 Ensaio de toxicidade aguda com <i>Vibrio fischeri</i>	91
4.2.3.1.2 Ensaio de toxicidade aguda com <i>Artemia</i> sp.....	92
4.2.3.1.3 Ensaio de toxicidade aguda com <i>Daphnia magna</i>	93
4.2.3.1.4 Ensaio de toxicidade subcrônica com <i>Allium cepa</i>	94

a) Teste de inibição de germinação de sementes e de crescimento de plântulas de <i>Allium cepa</i>	94
b) Ensaio de inibição do crescimento de raiz de bulbos de <i>Allium cepa</i>	95
4.2.3.1.5 Ensaio de toxicidade aguda com <i>Danio rerio</i> para determinação da dose de não efeito	96
4.2.3.1.6 Ensaio de toxicidade subcrônica com <i>Danio rerio</i>	97
a) Avaliação do dano às membranas celulares através da medida da lipoperoxidação (TBARS)	97
b) Glutathiona reduzida (GSH)	99
c) Atividade da enzima catalase (CAT).....	100
4.2.3.1.7 Ensaio de genotoxicidade com <i>Danio rerio</i>	101
a) Avaliação do dano ao DNA (Teste cometa).....	101
b) Avaliação do dano secundário ao DNA (Teste de micronúcleos).....	102
5 DISCUSSÃO	104
6 CONCLUSÕES	140
7 PERSPECTIVAS	142
REFERÊNCIAS	143

1 INTRODUÇÃO

1.1 Indústria têxtil no cenário brasileiro e em Santa Catarina

No Brasil, as indústrias têxteis concentram-se nas Regiões Sul e Sudeste, nas quais os estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Rio Grande do Sul e Santa Catarina se destacam (BRAILE; CAVALCANTI, 1993).

O segundo maior pólo têxtil em volume de produção do Brasil situa-se em Santa Catarina e localiza-se em áreas urbanas de elevada densidade demográfica, principalmente nos municípios de Blumenau e Brusque, onde se encontra a maior produção têxtil do sul do Brasil. Tal concentração industrial levou a uma situação de degradação ambiental da bacia hidrográfica do Rio Itajaí-Açu (SANTOS, 1996; WOLFF, 1997).

As indústrias de fiação e tecelagem do vale do Itajaí são algumas das maiores do setor na região sul, na qual representam 53,38 %, enquanto o litoral norte representa 17,23 %, o sul do estado 8,78 %, Florianópolis 8,45 %, extremo oeste 4,39 %, Lages 3,72 %, planalto norte 2,70 % e vale do Rio do Peixe 1,35 %. As principais cidades onde se concentram as indústrias têxteis são Blumenau, com 15,54 % das fiações e tecelagens; Brusque com 14,53 % e Joinville com 10,81 % (KNUT, 2001; SANTOS, 1996).

Citando dados do Instituto Brasileiro de Geografia e de Estatística (IBGE), o Banco Regional de Desenvolvimento do Extremo Sul (BRDE) (2004, 2005) apontou para Santa Catarina a variação de + 9,6 % (2004/2003) e + 9,1 % (2004/2005) na

produção industrial física para a indústria têxtil no primeiro semestre (meses de janeiro a maio) de cada ano, comparativamente ao ano anterior. Esta instituição aponta o desempenho do setor têxtil como um dos responsáveis pelo bom resultado da indústria catarinense no primeiro semestre de 2005. Este crescimento é resultado do alto nível de organização deste ramo empresarial, constatado pela Associação Brasileira da Indústria Têxtil e de Confecção (ABIT), que representa a integração da cadeia têxtil brasileira e é composta por inúmeros segmentos da indústria têxtil. Estes abrangem desde o cultivo do algodão, matérias-primas sintéticas, fibras têxteis, fiações, tecelagens, malharias, tinturarias e estamparias, até as confecções (ABIT, 2004). No entanto, todos os níveis produtivos são potencialmente capazes de gerar poluição (KNUT, 2001).

1.2 Potencial poluidor/degradador gerado pela indústria têxtil e legislação associada ao controle da poluição

As indústrias têxteis de vestuário e de artefatos de tecidos são atividades potencialmente poluidoras (emissão de gases e efluentes sólidos e líquidos) e/ou utilizadoras de recursos ambientais (uso de água) em seu processo produtivo segundo o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA, 2000). Também podem ser potencialmente contaminadoras do solo e das águas subterrâneas (IBGE, 1999). Isto se deve ao fato de que os efluentes das indústrias têxteis apresentam características físico-químicas próprias, tratando-se de misturas complexas de corantes, surfactantes, detergentes,

oxidantes, sais, etc. Ao longo do tempo, estes despejos podem variar de acordo com a utilização de novos reagentes, processos, maquinários e novas técnicas. Sua quantidade depende da demanda de consumo que, por sua vez, é determinada pela moda vigente em vestuário (BALAN, 1999, 2002; KIMURA, 2001; PEARCE; LLOYD; GUTHRIE, 2003).

Em Santa Catarina, a Portaria Intersectorial nº 01 de 1992 da Secretaria de Estado da Tecnologia, Energia e Meio Ambiente e da Fundação do Meio Ambiente (FATMA) aprovou a listagem das atividades consideradas potencialmente causadoras de degradação ambiental. Esta Portaria definiu que as atividades de fabricação de artefatos têxteis (estamparias e/ou tinturarias), apresentam um potencial poluidor/degradador de nível médio para o ar, de nível alto para a água e de nível médio para o solo (FATMA, 1992; KNUT, 2001). A Resolução nº 237 de 1997 do Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA, 1997), que além de definir as atividades potencialmente poluidoras e estabeleceu os critérios para o exercício da competência do Licenciamento Ambiental Municipal. Para determinar os níveis de potencial poluidor/degradador adotou-se uma avaliação geral englobando ar, água e solo, e uma avaliação específica para cada compartimento. Nesta Resolução foram apresentadas as atividades que são associadas às indústrias têxteis, de vestuário e de artefatos têxteis e seu potencial poluidor:

- a) Beneficiamento, fiação e tecelagem de fibras têxteis vegetais: potencial médio para a avaliação geral, médio para os compartimentos ar e água, e pequeno para o solo;
- b) Beneficiamento, fiação e tecelagem de fibras têxteis artificiais e sintéticas: potencial médio para a avaliação geral, médio para os compartimentos ar e água, e pequeno para o solo;

- c) Beneficiamento, fiação e tecelagem de materiais têxteis de origem animal: potencial médio para a avaliação geral, médio para os compartimentos ar e água, e pequeno para o solo;
- d) Fabricação de artefatos têxteis, com estamparia e/ou tintura: potencial grande na avaliação geral, médio para o ar, grande para a água, e médio para o solo;
- e) Serviços industriais de lavação, tingimento, alvejamento, estamparia e/ou amaciamento: potencial grande para a avaliação geral, médio para o ar, grande para a água, e médio para o solo;
- f) Confeções de roupas e artefatos de têxteis de cama, mesa, copa e banho, com tingimento e/ou estamparia: potencial grande para a avaliação geral, médio para o ar, grande para a água, e médio para o solo.

No entanto, para o efetivo controle da poluição não basta apenas o licenciamento. Deve haver um monitoramento dos efluentes gerados ao longo do processo industrial. Este importante aspecto está contemplado na Portaria nº 17 de 2002 (FATMA, 2002), onde foi estabelecido que a toxicidade aguda do efluente deve ser determinada em laboratório, mediante a condução de testes ecotoxicológicos padronizados, utilizando microcrustáceos e bactérias bioluminescentes. Esta portaria constituiu um avanço, já que em nível da federação, a obrigatoriedade dos ensaios toxicológicos foi determinada apenas a partir de 2005.

Em nível federal, na Resolução nº 237 de 1997 (CONAMA, 1997), ainda em vigor, foi estabelecida a obrigatoriedade do licenciamento ambiental para as atividades ou empreendimentos da indústria têxtil, de vestuário e artefatos de tecidos representadas por empresas que atuam no beneficiamento de fibras têxteis vegetais, de origem animal e sintéticas; na fabricação e acabamento de fios e tecidos; no tingimento, estamparia e outros acabamentos em peças do vestuário, e em artigos

diversos de tecidos. Tais empresas foram consideradas como apresentando um grau médio de degradação ambiental. Esta Portaria visou disciplinar a localização, instalação, ampliação e operação de empreendimentos e atividades utilizadoras de recursos ambientais consideradas efetiva ou potencialmente poluidoras ou daquelas que, sob qualquer forma, possam causar degradação ambiental (CONAMA, 1997).

A Resolução CONAMA nº 20 de 1986 (CONAMA, 1986) foi revogada e atualmente está em vigor a Resolução CONAMA nº 357 de 2005 que determina os padrões e limites máximos para lançamentos de efluentes em corpos de água receptores (CONAMA, 2005).

1.3 Etapas do processo produtivo têxtil e substâncias químicas utilizadas

Os processos na indústria têxtil abrangem desde a fiação até a tecelagem, durante os quais são adicionados vários compostos químicos, entre eles os detergentes e os corantes que são eliminados durante as etapas subsequentes. Desta forma, as operações de limpeza, tingimento e acabamento na indústria têxtil dão origem a uma grande quantidade de despejos. A recirculação destes despejos e a recuperação de produtos químicos e subprodutos constituem os maiores desafios enfrentados pela indústria têxtil com o fim de reduzir os custos com o tratamento dos mesmos. Assim, seus efluentes incorporam substâncias provenientes de todas as etapas úmidas, ou seja, que envolvem lavagem durante todo o beneficiamento de fibras têxteis tais como: engomagem, desengomagem, alveamento, mercerização, tingimento, vaporização e acabamento. Dependendo do processo e da matéria-

prima utilizada, os efluentes líquidos gerados no processo têxtil irão variar em quantidade e em sua composição. Por serem complexos e de elevada diversidade química, o tratamento por métodos convencionais em estações de tratamento de efluentes (ETE) apresenta diversos problemas, em especial o baixo nível de eficiência quanto à remoção de cor e a elevada produção de lodo (BRAILE; CAVALCANTI, 1993; KNUT, 2001; MELO FILHO, 1997).

Os fios em rolos ou bobinas passam por fervura em soluções de soda cáustica ou detergente (cozimento) e, após a lavagem, ocorre o tingimento por imersão dos fios em soluções contendo corantes, hidróxido de sódio e detergentes. Os fios tingidos em bobinas seguem para a tecelagem e os tingidos em rolos recebem um tratamento inicial com solução de goma de fécula de amido (engomação), para aumentar a resistência dos fios durante a tecelagem. Em seguida, os fios passam por um processo de desengomação utilizando glicose, enzimas, detergentes alcalinos quentes, sabões e emolientes dissolvidos em água. Durante o cozimento e a lavagem utiliza-se soda cáustica, detergentes e outros auxiliares na remoção de impurezas como ceras naturais, gorduras, álcoois e lubrificantes. Para o alvejamento do tecido utiliza-se principalmente hipoclorito de sódio, clorito de sódio, peróxido de sódio, peróxido de hidrogênio e hidrossulfito de sódio. A mercerização confere ao material têxtil celulósico maior resistência mecânica à ruptura, além de brilho. Nesta etapa utiliza-se soda cáustica e o acabamento é obtido através da aplicação de gomas e resinas em temperaturas controladas, além de surfactantes, uréia, formol e emulsões polietilênicas. Estas etapas podem ser observadas no fluxograma apresentado na figura 1 (BRAILE; CAVALCANTI, 1993; DOS SANTOS, 2005; KIMURA, 2001).

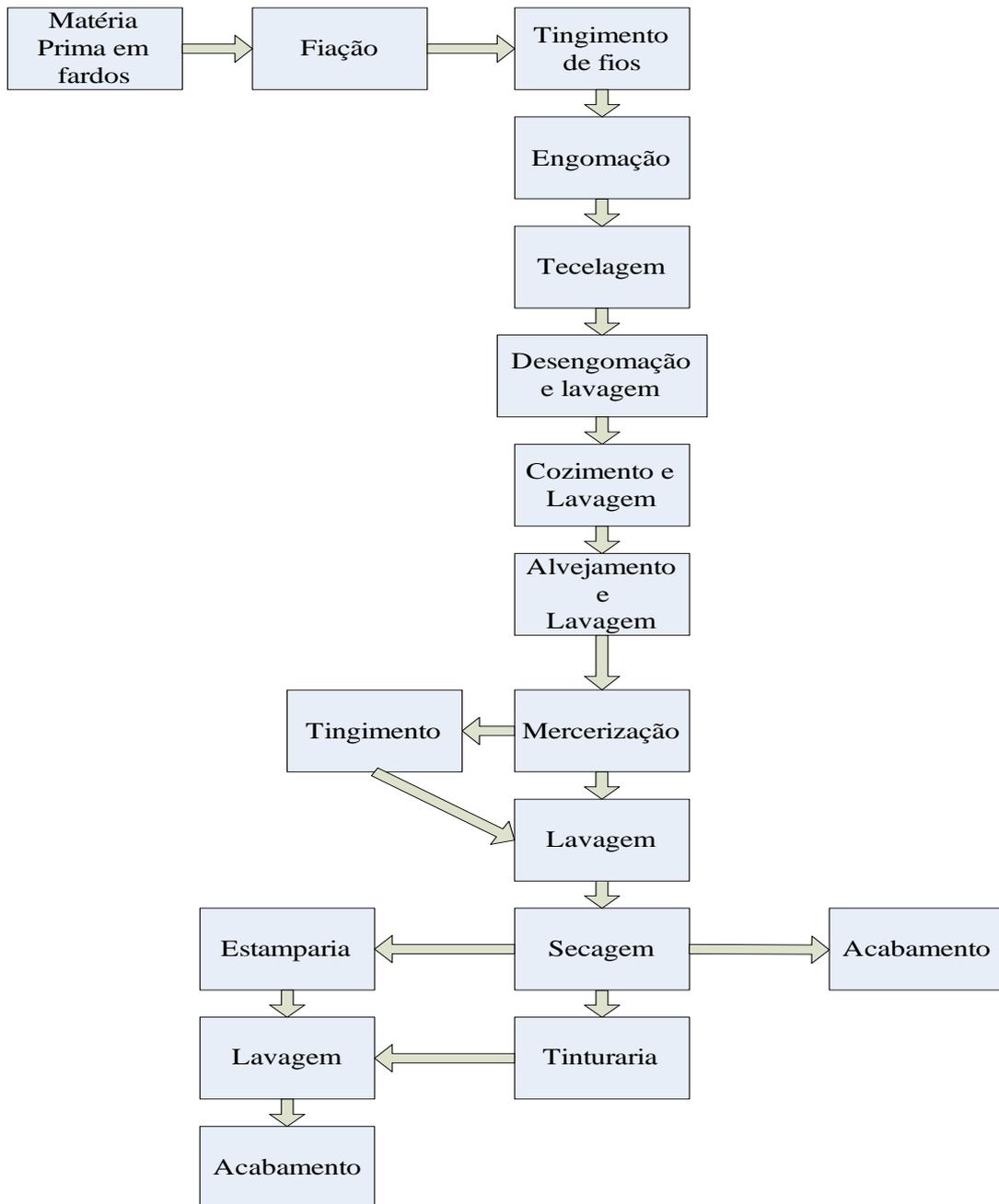


Figura 1 – Etapas do processamento de fibras de algodão em indústria têxtil (Modificado de DOS SANTOS, 2005).

Na estamparia de tecidos de algodão, a pasta é o veículo de aplicação do corante sobre o tecido. Esta pasta pode ser composta por uréia, espessante alginato de sódio, fosfato dissódico (para corantes diretos), bicarbonato de sódio (para corantes reativos) e sabões (SERVIÇO NACIONAL DE APRENDIZAGEM

INDUSTRIAL – SENAI; CENTRO DE TECNOLOGIA DA INDÚSTRIA QUÍMICA E TÊXTIL – CETIQT; DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR TECHNISCHE ZUSAMMENARBEIT - GTZ, 1998).

No processo de branqueamento das fibras utiliza-se como oxidante o hipoclorito de sódio e o cloreto de sódio. No entanto, na tinturaria os oxidantes utilizados são o dicromato de potássio, o cloreto de ferro (III) e o nitrito de sódio (PERUZZO, 2003).

Embora na literatura existam diferentes esquemas demonstrativos do processamento de fibras de algodão, de uma maneira geral as etapas apresentadas na figura 1 são as que ocorrem, com maior frequência, nas indústrias têxteis e afins.

Portanto, entre os produtos químicos mais utilizados na indústria têxtil destacam-se os ácidos (sulfúrico, clorídrico, fórmico, acético), bases (hidróxido de sódio, hidróxido de potássio, amônia, carbonato de sódio), sais (silicato de sódio, polifosfatos, fosfato de amônia, cloreto de amônia e cloreto de magnésio), oxidantes (peróxido de hidrogênio), solventes orgânicos (tetracloroetileno, metanol, etanol), ceras, parafinas, silicones (produtos de acabamento), espessantes (amido, éteres de amido, gomas vegetais), tensoativos (sabões, detergentes, dispersantes) (VANDEVIVERE; BIANCH; VERSTRAETE, 1998).

Porém, entre todas as substâncias químicas utilizadas no processo têxtil, os corantes constituem uma questão delicada em função do seu potencial poluidor. Fica claro o conflito existente entre as exigências dos órgãos ambientais fiscalizadores e a demanda por consumo de produtos mais coloridos. Nesta complicada equação devem ser inseridos elementos como as matérias-primas

necessárias à produção, tanto de corantes quanto de produtos têxteis, o controle da qualidade dos efluentes líquidos lançados, a capacidade de autodepuração dos corpos de água receptores e a resistência dos organismos que neles vivem. Este conflito pode sofrer uma redução significativa quando são adotados procedimentos para produção mais limpa na qual sejam empregadas substâncias que causem mínimos impactos ambientais (BASTIAN; SANTOS; FERRARI, 2001; CONAMA, 2005).

1.3.1 Corantes

Corantes são definidos como “substância, geralmente orgânica, desenvolvida para ser absorvida ou adsorvida, ou reagir com, ou ainda ser depositada em um substrato de forma a imprimir cor ao mesmo, com algum grau de permanência” (SOCIETY OF DYERS AND COLOURISTS, 2005).

Corantes e pigmentos são colorantes que diferem entre si por sua solubilidade. Os corantes que forem parcialmente ou completamente dissolvidos em um líquido podem ser aplicados sobre diferentes substratos (materiais têxteis, papel, cabelos, couro, entre outros). Já os pigmentos são praticamente insolúveis nos meios nos quais eles são aplicados. Colorantes são caracterizados por sua capacidade de absorver luz no espectro visível (400 a 700 nm), por esta razão parecem coloridos (TROTMAN, 1984; ZOLLINGER, 1991).

Entre os fatores que determinam a seleção do corante a ser utilizado se destacam a sua afinidade por uma fibra têxtil e o processo de tingimento (contínuo, semicontínuo e por esgotamento), além das características técnicas desejadas para o produto em termos de solidez como, por exemplo, à luz, à fricção e ao suor (ABIQUIM, 2005).

Até a metade do século XIX todos os corantes orgânicos eram derivados de partes de vegetais e de substâncias extraídas de animais. Embora a indústria de corantes tenha se originado na Europa durante o século XVI, o primeiro corante sintético foi descoberto em 1856 na Inglaterra (GUARATINI; ZANONI, 2000).

No Brasil, desde a época colonial, os corantes têm desempenhado um papel especial. O nome que o país recebeu deriva de um corante que provém de uma árvore conhecida como pau-brasil (*Caesalpinia echinata*), cuja cor vermelha é atribuída a um composto conhecido como brasileína que, na realidade, é um produto da oxidação da brazilina, presente no lenho da árvore. A fórmula dos corantes brazilina e brasileína foi determinada por Liebermann e Burg em 1883 (ABIQUIM, 2005).

O Colour Index, catálogo da Society of Dyers and Colourists, registra que atualmente mais de oito mil corantes sintéticos são empregados na indústria têxtil (ZANONI; CARNEIRO, 2001).

A utilização de corantes no Brasil concentra-se principalmente nos corantes reativos para fibras celulósicas que hoje respondem por 57 % do mercado, seguidos pelos corantes dispersos com 35 % (ABIQUIM, 2005).

Souza e Peralta-Zamora (2005) atribuem aos azo corantes 60 % do mercado consumidor brasileiro. Entre estes se destacam os corantes reativos com 57 % do mercado consumidor e os corantes dispersos com 35 % (ABIQUIM, 2005).

1.4 Classificação de corantes

A norma técnica NBR 5766 de 1974 da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), estabelece a classificação de corantes orgânicos e sintéticos comercializados no Brasil (ABNT, 1974).

Os corantes são classificados segundo o Colour Index (CI), conforme sua classe química, e de acordo com o método de fixação à fibra têxtil. Com relação à classe química dos corantes, estes são classificados de acordo com a estrutura química do grupo cromóforo. Os grupos mais importantes são azos, antraquinona e ftalocianina (HAO; KIM; CHANG, 2000; KUNZ et al., 2002).

Entre os vários grupos cromóforos utilizados na síntese de corantes, o grupo mais representativo e que é mais amplamente empregado no tingimento de fibras têxteis estão os azo corantes. Estes se caracterizam por apresentarem um ou mais grupamentos $-N=N-$ ligados a sistemas aromáticos. Estes são encontrados entre os corantes básicos, ácidos, diretos, mordentes e reativos (KIMURA, 2001; VANDEVIVERE; BIANCHI; VERSTRAETE, 1998).

Em termos de utilização na indústria têxtil, adota-se a classificação de acordo com a aplicação dos corantes ou o modo de fixação às fibras (GUARATINI;

ZANONI, 2000; KIMURA, 2001; TROTMAN, 1984): básicos, ácidos, diretos ou substantivos, mordentes ou pré-metalizados, ao enxofre ou sulfurosos, azóicos, à cuba, dispersos ou dispersivos, reativos e branqueadores.

Na tabela 1 são apresentadas outras características dos corantes como estrutura química (azo, antraquinona, etc.). Como a estrutura química do corante interfere no processo de tingimento e na afinidade dos corantes por determinadas fibras têxteis, então o emprego de um tipo de corante é determinado por sua estrutura que também pode causar toxicidade do corante ou de produtos intermediários de sua degradação, bem como sua solubilidade a qual, por sua vez, interfere diretamente no processo de tingimento e na qualidade do mesmo (ASPLAND, 1992a, 1992b; BASTIAN; SANTOS; FERRARI, 2001; GUARATINI; ZANONI, 2000; KIMURA, 2001; TROTMAN, 1984; ZOLLINGER, 1991).

Na indústria têxtil em estudo no presente trabalho são utilizados principalmente os corantes pertencentes ao grupo conhecido comercialmente como remazol, que no Colour Index são denominados como corantes reativos (BURKINSHAW; JARVIS, 1996).

Tabela 1 – Classificação dos corantes, principais características (estrutura química e solubilidade de corantes), fibras nas quais são aplicados, e exemplos de corantes em uso (ABIQUIM, 2005; ASPLAND, 1992a, 1992b; GIRARDI; VALLDEPERAS; LIZ, 1999; GUARATINI; ZANONI, 2000; KIMURA, 2001; TROTMAN, 1984; ZOLLINGER, 1991).

Classes de corantes	Estrutura química	Solubilidade	Fibras (*)	Exemplos
Básicos	Azo, antraquinona, triarilmetano, triazina, acridina, quinolina.	Hidrossolúveis.	PROT	CI Básico Violeta 2
Ácidos	Azo, azina, antraquinona, triarilmetano, trimetil-metano, xanteno, nitro, nitroso, quinolina, ftalocianinas.		PROT SINT	CI Amarelo 1
Diretos ou substantivos	Azo (diazó, triazo)	Hidrossolúveis.	CEL	CI Direto Amarelo 2
Mordentes ou pré-metalizados	Azo		CEL PROT SINT	CI Mordente Laranja
Ao Enxofre ou sulfurosos	Macromoléculas com pontes de polissulfetos	Compostos altamente insolúveis em água, hidrossolúveis em solução de sulfito de sódio e hidrossulfito de sódio e após redução são insolúveis no interior da fibra onde interagem.	CEL	CI Enxofre Laranja 1
Azóicos	Azo	Componente naftol é insolúvel em água, com a adição de hidróxido de sódio forma naftolato que é um agente de acoplamento hidrossolúvel, Componente base insolúvel em água, com a adição de nitrito de sódio ou ácido clorídrico, forma base diazotada ou sal de diazônio (RN^{2+}) que reage com o agente de acoplamento, já fixo à fibra, e produz um corante insolúvel em água.	CEL PROT SINT	Corante Vermelho obtido através da reação entre metanitro-ortotoluidina e ácido beta-hidroxi-naftóico.

(continuação...)		Insolúveis em água, com a adição de hidróxido de sódio e de hidrossulfito de sódio convertem-se em compostos leuco-solúveis, que são absorvidos pelas fibras onde sofrem oxidação e formam um pigmento colorido insolúvel.		
À cuba	Antraquinona, índigo		CEL	CI Cuba Preto 1
Dispersos	Azo	Não completamente insolúveis em água.	SINT	CI Disperso Laranja
Reativos	Azo, mono e diazo, (metalizado ou não metalizado), trifenodioxazina, ftalocianina, antraquinona.	Hidrossolúveis.	CEL PROT SINT	CI Reativo preto 5
Branqueadores	Grupos carboxílicos azometinos (-N=CH-), ou etilênicos (-CH=CH) aliados a sistemas benzênicos, naftalênicos, pirênicos e anéis aromáticos.		CEL	Cumarina, derivados estilbênicos obtidos da condensação de cloreto cianúrico com ácido diamino-estilbeno-dissulfônico, seguido de condensação sucessiva com outras aminas.

(*) Tipos de fibras onde os corantes podem ser aplicados: CEL = fibras celulósicas (algodão), PROT = protéicas (lã, seda), SINT = fibras sintéticas (poliamidas sintéticas, poliéster, nylon, diacetato de celulose, triacetato de celulose, acrílicas).

1.4.1 Corantes reativos

Os corantes reativos são compostos que contêm um ou mais grupos reativos que formam ligações covalentes com um átomo de oxigênio, de nitrogênio ou de enxofre de fibras celulósicas (grupo hidroxil), fibras protéicas (grupos amino, hidroxil

e mercaptano) e poliamidas (grupo amino). O primeiro corante comercial com dois grupos reativos (vinilsulfona) foi o reativo preto 5, que é um azo corante recomendado para fibras celulósicas e protéicas (lã). Com relação ao tipo estrutural, existem dois grupos principais: o grupo com anel heterocíclico e o grupo com vinilsulfona (ASPLAND, 1992a, 1992b; TROTMAN, 1984; ZOLLINGER, 1991).

A molécula de um corante reativo apresenta estruturalmente uma combinação de grupos denominados como grupo cromóforo (C), grupo de solubilização (S), grupo de ligação (L), grupo reativo (R) e grupo de saída (X), conforme figura 2. Os grupos (L), (R) e (X) têm efeito nas propriedades físicas da molécula como um todo, entre as quais a cor, massa molar, solubilidade e capacidade de difusão para o interior da fibra, entre outros. Todos os grupos, com exceção do (X), são solúveis em água. O grupo cromóforo (C) é a parte da molécula que é colorida e pode ser azo (-N=N-). Cerca de 80 % de todos corantes reativos apresentam este grupo cromogênico. Os demais podem ser do tipo trifenodioxazina, ftalocianina ou antraquinona. Todos os corantes reativos apresentam em suas moléculas, como grupo para solubilização em meio aquoso (S), o sulfonato de sódio (-SO₃Na). Faz parte também da molécula dos corantes reativos um grupo de ligação (L) entre a parte reativa da molécula e a parte solúvel colorida que pode ser um grupo imino (-NH-), ou amida (-NHCO-), ou sulfona (-SO₂-), entre outros. Os corantes reativos apresentam em sua molécula um característico grupo reativo (R), que pode ser um anel heterocíclico ou um radical vinilsulfona (-SO₂-CH=CH₂), e um grupo de saída (X), que podem ser íons (Cl⁻, F⁻, Br⁻) e CH₃SO₂ (ASPLAND, 1992a, 1992b; ZOLLINGER, 1991).

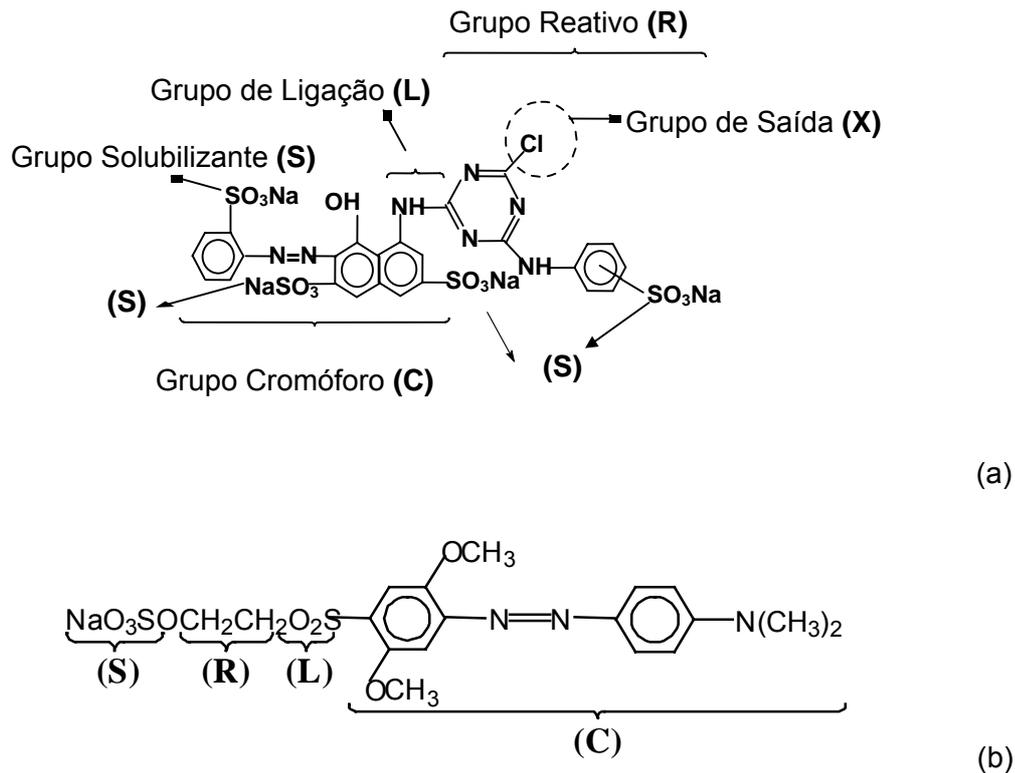


Figura 2 – Representação das unidades que compõem as estruturas dos corantes reativos. (a) grupo reativo triazina e (b) grupo reativo vinilsulfona (baseada em KIMURA, 2001).

1.5 Tratamento de efluentes de uma indústria têxtil

O tratamento de efluentes a serem lançados em corpos receptores visa à adequação dos parâmetros aos limites estabelecidos por regulamentação específica, e, desta forma, reduzir os efeitos prejudiciais sobre os organismos. O monitoramento dos efluentes a serem lançados nos corpos receptores deve ser realizado de maneira a serem respeitados os limites dos padrões para os efluentes a serem lançados, impostos em legislação pertinente nas esferas federal, estadual e municipal (CONAMA, 2005; FATMA, 2002).

A Resolução CONAMA nº 357/05 define como formas de tratamento de efluentes industriais o tratamento convencional e o avançado (CONAMA, 2005).

No tratamento convencional, a clarificação é realizada através dos processos de coagulação e de floculação, seguidos de desinfecção e correção do pH. Já para o tratamento avançado devem ser aplicadas técnicas de remoção e/ou inativação de constituintes refratários aos processos convencionais de tratamento. Estes constituintes podem conferir à água características como cor, sabor, odor e atividade tóxica (CONAMA, 2005). Na figura 3 encontram-se as principais formas de tratamento de efluentes coloridos realizadas na atualidade (KARAPINAR et al., 2000).

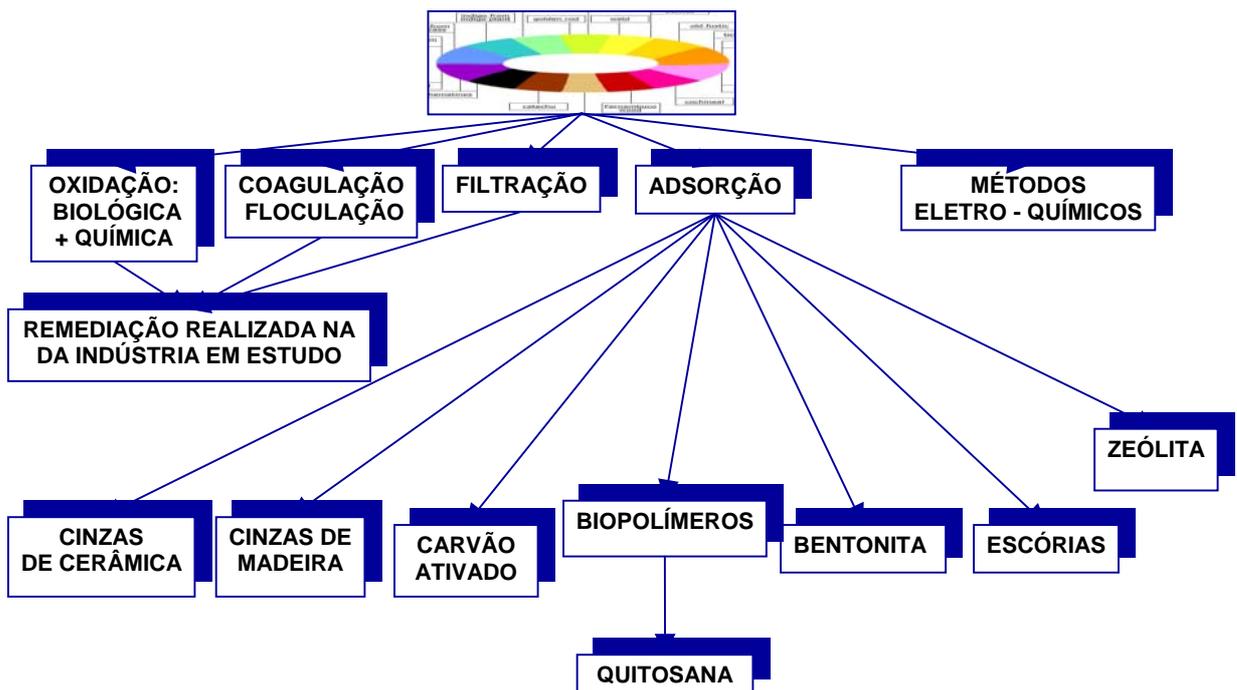


Figura 3 – Principais métodos de tratamento de efluentes coloridos (modificado de KARAPINAR et al., 2000).

O processo de tratamento convencional de efluentes têxteis envolve inúmeras etapas devido às características do processo produtivo. Os efluentes

podem sair dos processos em alta temperatura (entre 60 °C e 90 °C) ou em temperatura ambiente. Os efluentes são captados e recebem uma injeção de gás carbônico para a neutralização do pH. Em seguida, passam por dispositivos de tratamento físico (grades, caixas de areia, peneiras estáticas) para a retirada de sólidos em suspensão, fibras de algodão, restos de pastas, etc; depois seguem para os tanques de neutralização e equalização. No tanque de neutralização é efetuada nova medição do pH, pois as estações são projetadas para tratarem os efluentes com pH variando entre 8 e 10. Após a equalização, os efluentes seguem para os tanques de aeração onde permanecem de 24 a 36 h, e depois vão para o decantador secundário. A aeração constitui importante passo no processo de tratamento biológico propriamente dito, já que os aeradores irão fornecer oxigênio às bactérias e demais organismos da microfauna, presentes no lodo ativado, que é necessário à decomposição aeróbica da matéria orgânica. Esta matéria confere turbidez ao efluente juntamente com outros materiais em suspensão. Nesta fase, os nutrientes para os organismos são fornecidos pelo esgoto sanitário que é gerado na empresa. Após a adição de um agente coagulante, ocorre floculação dos materiais em suspensão, que se depositam no decantador levando à redução da turbidez bem como à remoção da cor do efluente. Neste processo o efluente fica por aproximadamente 12 h. No final, uma parte do lodo do decantador é concentrada em um filtro-prensa e enviada para o aterro industrial, e outra parcela volta para os tanques de aeração (recirculação) para realimentar as bactérias e a microfauna. Estas etapas são apresentadas na figura 4 (BASTIAN; SANTOS; FERRARI, 2001; SANTOS, 1996; VAZOLLÉR, 1989).

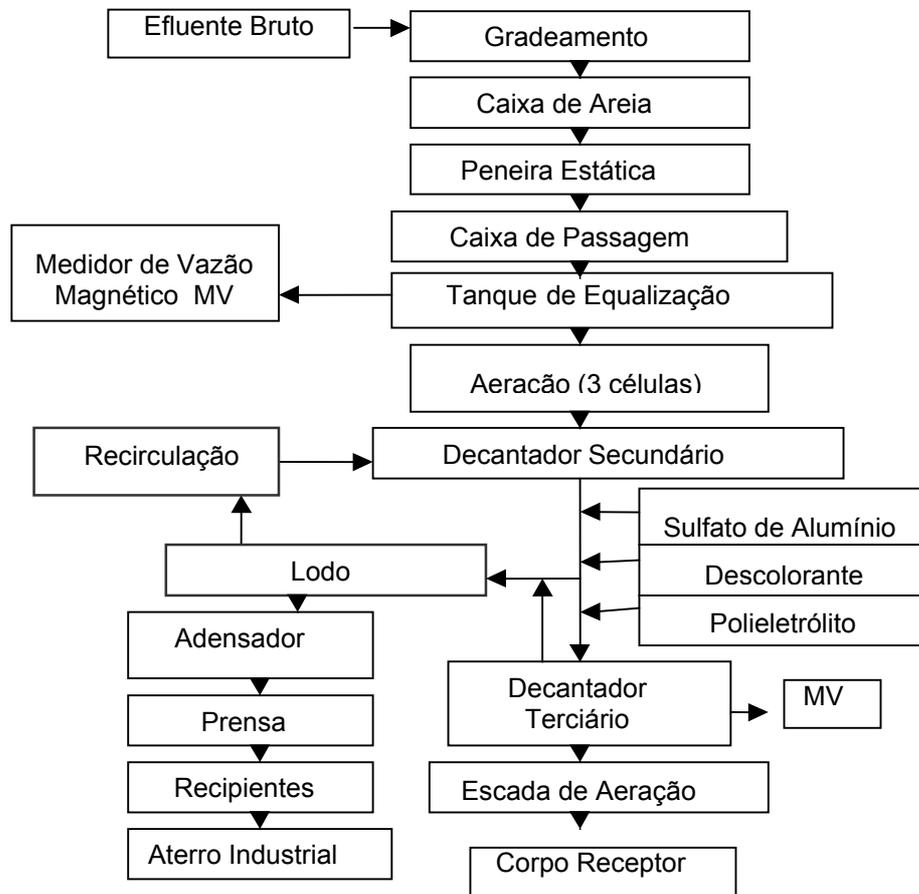


Figura 4 – Planta de tratamento de efluentes da empresa em estudo (fonte: gerência da empresa fornecedora do efluente têxtil avaliado no presente trabalho).

O tratamento convencional envolve um processo de coagulação/floculação no qual ocorre a agregação de colóides e partículas dissolvidas em flocos maiores, que podem ser sedimentados por ação da gravidade, resultando na remoção dos mesmos da fase líquida (KIMURA, 2001). Trata-se de um processo versátil e pode ser utilizado sozinho ou combinado com o tratamento biológico, de forma a remover sólidos em suspensão e matéria orgânica, assim como promover uma elevada remoção da cor de efluentes de indústrias têxteis (TÜNAY, 1996; MERIÇ; SELÇUK;

BELGIORNO, 2005). No entanto, este processo apresenta como desvantagem o grande volume de lodo gerado (KUNZ et al., 2002). Este lodo é rico em corantes, além das demais substâncias utilizadas no processo têxtil. Portanto, torna-se um problema, devendo ser descartado de maneira adequada para evitar contaminação ambiental (BASTIAN; SANTOS; FERRARI, 2001).

Os tratamentos descritos acima envolvem processos não destrutivos fundamentados em coagulação, seguidos de separação por flotação ou sedimentação e também processos destrutivos que ocorrem na etapa de tratamento biológico (lodos ativados). Tais tratamentos, apesar da sua eficiência relativamente elevada com aproximadamente 80 % de remoção da carga de corantes e de material particulado, apresentam uma geração de lodo onde os corantes que foram adsorvidos não podem ser reaproveitados (KUNZ et al., 2002).

1.6 Aspectos dos corantes relacionados à poluição

A poluição visual dos corpos de água por efluentes da indústria têxtil ou por corantes presentes em esgotos domésticos não é um problema apenas estético, já que pode afetar o processo de fotossíntese devido à ocorrência da diminuição da transparência da água o que dificulta a entrada dos raios solares (KUNZ et al., 2002).

Esta cor está associada à presença de determinadas estruturas na molécula dos corantes. No caso de azo corantes, estes apresentam moléculas com duas

partes principais, uma é parte da molécula que se liga à fibra têxtil e a outra é o grupo cromóforo, que pode apresentar um ou mais grupamentos -N=N- ligados a sistemas aromáticos, apresentado na figura 5. O cromóforo corresponde à parte da molécula orgânica capaz de absorver luz seletivamente e apresenta como principal característica um sistema de dupla ligação conjugada (por exemplo, C=C, C=O, N=N, etc), responsável pela absorção molecular. Quando estes cromóforos estiverem ligados a alguns grupos saturados, verifica-se que ocorre alteração do comprimento de onda além de alterações na intensidade de absorção. O conjunto formado por cromóforo e grupos saturados é denominado como auxócromo, com tendência a ser polar, o que aumenta a polaridade do corante e, conseqüentemente, sua solubilidade em água (ZOLLINGER, 1991).

Os azo corantes são os corantes sintéticos mais liberados no meio ambiente por indústrias têxteis, químicas e farmacêuticas (DOS SANTOS, 2005).

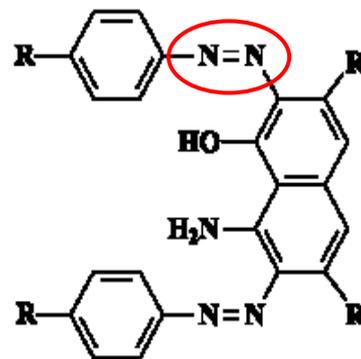


Figura 5 – Exemplo de estrutura química de azo corante, em destaque o grupo azo (-N=N-) (Fonte: KUNZ et al., 2002).

A entrada de corantes no meio ambiente ocorre basicamente por quatro vias, ou seja, através de emissões ou descargas de efluentes nos processamentos rotineiros, do descarte de sobras e resíduos dos processos, de embalagens usadas

e de eliminação acidental (BALAN, 2002). Uma vez contaminando o meio, os corantes que são xenobióticos, podem causar toxicidade aos organismos aquáticos (KUMAR et al., 2006, DOS SANTOS et al., 2005).

1.6.1 Toxicidade de corantes azo e antraquinona

A toxicidade de produtos da degradação de corantes cuja estrutura química é do tipo azo é atribuída à formação de amins aromáticas durante a quebra do corante por redução química ou enzimática (Figura 6). Em sua estrutura as amins aromáticas apresentam um ou mais anéis aromáticos com um ou mais radicais amino, além de terem sido consideradas como sendo potencialmente carcinogênicas e genotóxicas, causando toxicidade para a vida aquática e para humanos (OH et al., 1997; PIELESZ et al., 2002; PINHEIRO; TOURAUD; THOMAS, 2004).

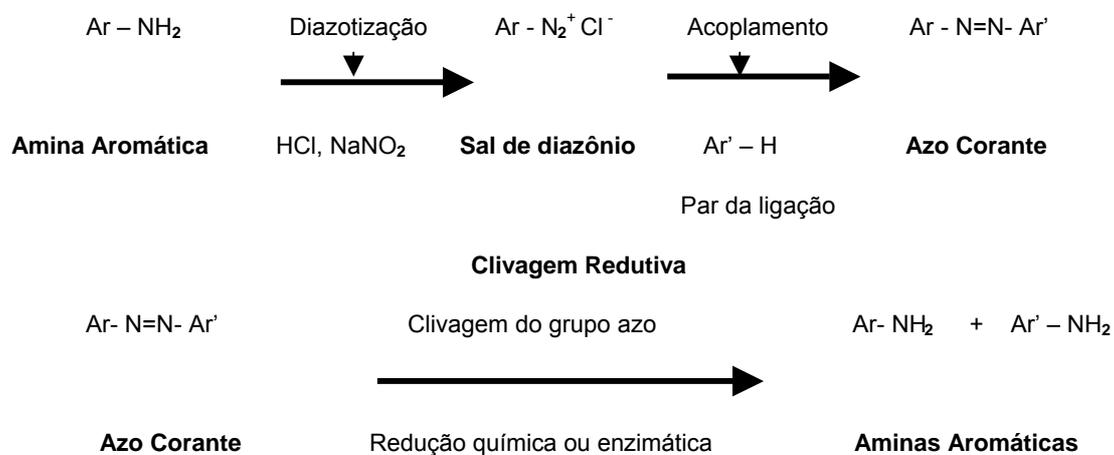


Figura 6 – Síntese de azo corantes e formação de amins aromáticas após clivagem redutiva química ou enzimática (modificado de OH et al., 1997).

Na figura 7 é apresentado um exemplo de amina aromática (benzidina) derivada da degradação em condições anaerobióticas de um corante azo banido pela Comissão Europeia. Os azo corantes e seus derivados podem estar presentes em brinquedos, roupas e até na água. Desta maneira, a via oral e a absorção dérmica são as principais vias de exposição de humanos a azo corantes e seus produtos de degradação (AHLSTRÖM; ESKILSSON; BJÖRKLUND, 2005). É importante ressaltar que a benzidina foi considerada carcinogênica para humanos em relatório da International Agency for Research on Cancer (IARC), assim como alguns metais e outros compostos derivados de azo corantes (IARC, 1972, 1980, 1990; PINHEIRO; TOURAUD; THOMAS, 2004).

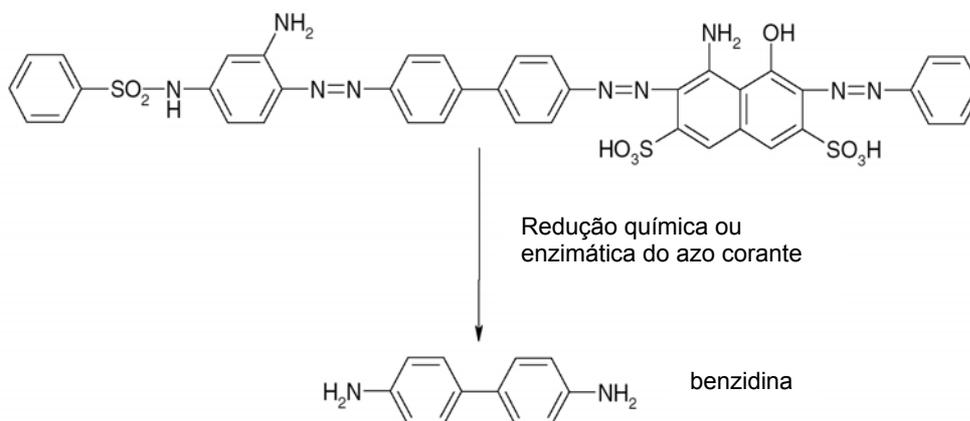


Figura 7 – Exemplo da redução de um azo corante banido (ácido preto 077) em uma amina carcinogênica (benzidina) (modificado de AHLSTRÖM; ESKILSSON; BJÖRKLUND, 2005).

A concentração máxima permitida de benzidina para águas doces da classe I é de $0,001 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para rios cujas águas sejam captadas para consumo humano. Para rios nos quais haja pesca ou cultivo de organismos para consumo é de $0,0002$

$\mu\text{g.L}^{-1}$. A classe I é constituída por rios cujas águas são destinadas ao abastecimento público tratada apenas com desinfecção (CONAMA, 2005).

Bastian, Santos e Ferrari (2001) mencionam uma lista inclusa em um guia de prevenção à poluição para as indústrias têxteis, onde são apresentados alguns dos principais azo corantes que possuem a base benzidina, e também foram citados vários corantes básicos, ácidos, diretos, mordentes, azóicos e dispersos. Tal lista constitui motivo de preocupação, já que estes corantes ainda são utilizados nas empresas, embora tenham sido banidos (BROWN; HAMBURGER, 1987; WEBER; WOLFE, 1987; SPONZA; IŞIK, 2005). Isto é agravado ao considerar-se que, nos efluentes gerados por estas empresas em condições de anaerobiose, formam-se as aminas aromáticas carcinogênicas, as quais se acumulam por não sofrerem degradação (BROWN; LABOUREUR, 1983; FIELD et al., 1995). Desta forma, o acúmulo de benzidina nos sedimentos de locais onde se situam as plantas de tratamento de efluentes torna tais sedimentos potencialmente contaminantes para os ecossistemas aquáticos (SPONZA; IŞIK, 2005). Por outro lado, estudos indicam que a maioria das aminas aromáticas é degradada em condições aeróbicas ou em reatores combinados anaeróbicos/aeróbicos (IŞIK; SPONZA, 2003, 2004; PINHEIRO; TOURAUD; THOMAS, 2004; SPONZA; IŞIK, 2005; SUPAKA et al., 2004). O uso destes corantes que geram poluentes deve ser sujeito a regras, além de haver um tratamento mais adequado dos efluentes gerados de maneira a promover a detoxificação dos mesmos (SPONZA; IŞIK, 2005), principalmente quando se tem em mente que em vários países justifica-se o uso dos mesmos, em função dos baixos custos e eficiência no tingimento (SNYDERWINE et al., 2002).

Infelizmente, não apenas os azo corantes são motivos de preocupação, pois em estudo recente no qual foram empregados corantes do tipo antraquinona, verificou-se toxicidade no produto de sua degradação em condições anaeróbicas. O tratamento consistiu na exposição do efluente têxtil e do corante em bioreatores mantidos em condições anaerobióticas mesófilas (30 °C) e termófilas (55 °C). Houve descoloração, tanto de efluente de indústria têxtil quanto de um corante do tipo antraquinona denominado como reativo azul 19. Porém, esta descoloração foi total apenas a 55 °C. Nestas condições o corante apresentou toxicidade uma vez que houve redução de 50 % na atividade dos microrganismos metanogênicos presentes no lodo. No entanto, não foram afetados os microrganismos oxidantes de glicose incluindo os acetogênicos e os fermentadores formadores de propionato, de butirato e de butanol. Em ensaios complementares, empregando-se cepas previamente expostas ao corante; verificou-se que mesmo após a remoção do corante do meio manteve-se a inibição aos microrganismos indicando a irreversibilidade da toxicidade causada pela exposição preliminar (DOS SANTOS, 2005; DOS SANTOS et al., 2005).

A toxicidade dos corantes pode estar relacionada também a presença de metais em sua estrutura química. Por esta razão, recomenda-se que estes sejam evitados ou substituídos por corantes que não causem danos aos organismos expostos. Na tabela 2 são apresentados alguns dos corantes ácidos, diretos e reativos que possuem metais associados em sua estrutura química (BASTIAN; SANTOS; FERRARI, 2001).

Tabela 2 – Relação de corantes que apresentam metais na estrutura molecular (BASTIAN; SANTOS; FERRARI, 2001; ZOLLINGER, 1991).

Corante	Metal
Azul Ingraim 5 Azul Vat (à cuba) 29	Cobalto
Azul Ingraim 14	Níquel
Azul Ácido 249; Azul Direto 86, 87 e 218; Azul Ingraim 1, 13; Azul Reativo 7, 17 Azul Solvente 24, 25, 55; Verde Ingraim 3 Vermelho direto 180	Cobre

1.7 Bioindicadores utilizados na avaliação de toxicidade de efluentes têxteis

A obrigatoriedade da realização de testes de toxicidade utilizando organismos bioindicadores garante o fornecimento de informações imprescindíveis sobre a qualidade do efluente a ser lançado no corpo receptor, cujas características físico-químicas e biológicas devem ser respeitadas (CONAMA, 2005).

O monitoramento utilizando os bioindicadores, ou biomonitoramento, possibilita avaliar a qualidade das águas superficiais que recebem efluentes industriais. Com esta abordagem, busca-se oferecer mais informações sobre os impactos ocasionados nos organismos pelas tecnologias de produção empregadas e, desta forma, estimular a mudança de tecnologia para uma nova, na qual sejam produzidos materiais não-poluentes. Neste contexto, a Biotecnologia Ambiental se insere com vantagens, contribuindo para manter o ambiente limpo através da remediação e do biomonitoramento de todos os tipos de efluentes industriais (GAVRILESCU; CHISTI, 2005).

Além disto, a avaliação de efluentes através de análises químicas é incompleta, uma vez que nada informam a respeito do efeito tóxico provocado por substâncias presentes nos efluentes (SCHLENK, 1999). De fato, as análises químicas devem ser complementadas com ensaios ecotoxicológicos para se determinar a qualidade de efluentes a serem lançados em corpos de água de superfície (CONAMA, 2005). Entre os organismos utilizados destacam-se *Vibrio fischeri*, *Daphnia magna*, *Danio rerio* (KNIE; LOPES, 2004) e *Allium cepa* (ARAMBASIC; BJELIC; SUBAKOV, 1995).

1.7.1 *Vibrio fischeri*

A bactéria bioluminescente *Vibrio fischeri* (Beijerinck, 1889) Lehmann & Newmann, 1896 (Proteobacteria, Ordem Vibrionales, Família Vibrionaceae), é gram-negativa. Este microrganismo heterotrófico apresenta distribuição mundial e pode ser encontrado como simbiote em várias espécies de lulas e peixes, como patógeno de invertebrados e como saprófito de vida livre, desenvolvendo-se sobre matéria orgânica dissolvida ou particulada presente no mar (WILLIAM MYRON KECK FOUNDATION, 2002). São anaeróbios facultativos que emitem luz em condições ambientais favoráveis (KNIE; LOPES, 2004).

A variação de bioluminescência emitida por *V. fischeri* que são simbioses de lulas (*Euprymna scolopes*) foi descrita por Boettcher e Ruby (1990). Segundo estes autores a emissão de luminescência ocorre devido à ação de um grupo de genes denominado como *lux operon*, que tem sido utilizado em inúmeras aplicações

biotecnológicas associadas ao monitoramento, devido ao fato de que a produção de luz pode ser controlada sob condições experimentais e ligada a uma condição ambiental específica.

Os ensaios com bactérias bioluminescentes apresentam algumas vantagens, já que podem ser realizados com pequeno volume de amostras de água doce ou salina e são relativamente fáceis de executar. Além disso, a rapidez na obtenção dos resultados, após 30 min de exposição, permite uma resposta rápida em casos de acidentes ambientais. Como as bactérias podem ser mantidas congeladas ou liofilizadas, isto reduz os custos (KNIE; LOPES, 2004).

Em estudos realizados por Ledakowicz, Solecka e Zylla (2001), verificou-se a toxicidade de efluente têxtil contendo corante antraquinona, detergente aniônico e amaciante, antes e após o efluente ser tratado através de processos avançados de oxidação, utilizando como organismo bioindicador *V. fischeri*. Estas bactérias também foram utilizadas para verificar a toxicidade aguda de efluentes de uma indústria têxtil tratados e não tratados (BAPTISTA et al., 2002), e de chorume de aterro sanitário (SILVA; DEZOTTI; SANT'ANNA JÚNIOR, 2004).

Anualmente, as empresas brasileiras potencialmente poluidoras, além de efetuarem ensaios ecotoxicológicos agudos com bactérias bioluminescentes, devem realizar ensaios agudos com *Daphnia magna*, utilizando os efluentes finais gerados na estação de tratamento de efluentes que serão lançados no meio ambiente, de maneira complementar as análises físico-químicas (CONAMA, 2005).

1.7.2 *Artemia* sp

Outro importante organismo bioindicador que tem sido alvo de estudos são os microcrustáceos zooplanctônicos de ambientes de águas salgadas representados por várias espécies pertencentes ao gênero *Artemia* Leach 1819 (Classe Crustacea, Ordem Anostraca, Família Artemiidae). O nome específico *Artemia salina* Linnaeus 1758, já não é mais válido taxonomicamente devendo-se empregar somente *Artemia* sp no caso de não identificação da espécie (SORGELOOS et al., 1986); embora *A. salina* ainda seja empregado por alguns autores (EL-NAGGAR; EL-AASAR; BARAKAT, 2004; SILVA; DEZOTTI; SANT'ANNA JÚNIOR, 2004).

Estes microcrustáceos são fontes significativas de alimento para invertebrados aquáticos e para peixes, por isso são ambientalmente importantes (SORGELOOS et al., 1986). O emprego destes organismos em bioensaios deve-se ao fato dos mesmos apresentarem distribuição cosmopolita; possuírem cistos de dormência e, principalmente, apresentarem fácil manutenção em laboratório (BARAHONA; SÁNCHEZ-FORTÚN, 1999). Outra vantagem consiste no fato da eclosão ocorrer com organismos apresentando idade similar, além de mínimas variações nas condições fisiológicas e genéticas (PERSOONE et al., 1980).

O método baseia-se na verificação da imobilidade dos náuplios quando expostos às soluções de diferentes compostos. Entre as vantagens do teste destacam-se o baixo custo, a rapidez e a simplicidade (MEYER et al., 1982), assim como a sensibilidade e possibilidade de realização de testes com muitas substâncias e com indivíduos de diferentes idades ao mesmo tempo (BARAHONA; SÁNCHEZ-FORTÚN, 1996; FORTÚN et al., 1997).

Por outro lado, para realizar estudos mais completos de toxicidade aguda de efluentes, devem ser utilizados organismos de diferentes níveis tróficos, principalmente peixes (BAPTISTA, 2001). Dentre estes, a espécie *Danio rerio* tem sido muito utilizada por mostrar sensibilidade a diferentes contaminantes ambientais (KNIE; LOPES, 2004).

1.7.3 *Daphnia magna*

Os microcrustáceos do plâncton de água doce *Daphnia magna* Straus, 1820 e *Daphnia similis* Straus, 1820 (Cladocera, Crustacea), vulgarmente conhecidos como pulgas-d'água são recomendados para efetuarem a avaliação da toxicidade aguda de amostras de efluentes líquidos, águas continentais superficiais ou subterrâneas e substâncias químicas solúveis ou dispersas em água (ABNT, 2003).

O método consiste na exposição de indivíduos jovens (neonatos) de *D. magna* por períodos de 24 a 48 h (teste agudo), a várias diluições de uma amostra. Ao término do tempo, são verificados os seus efeitos sobre a capacidade natatória (mobilidade) dos organismos (KNIE; LOPES, 2004).

O método apresenta algumas vantagens, entre as quais o fato dos organismos apresentarem variabilidade genética mínima, o que assegura alguma uniformidade de respostas dos ensaios. Seu manuseio é simples e a manutenção em aquários sob condições controladas facilita a cultura no laboratório. A espécie é sensível a uma ampla gama de compostos químicos nocivos além de se adaptar

bem a ensaios estáticos, semi-estáticos e de fluxo contínuo. Também é reconhecida internacionalmente como organismo-teste há muito tempo. E finalmente, os ciclos de vida e reprodutivo são suficientemente curtos, permitindo seu uso em testes crônicos (ABNT, 2003; KNIE; LOPES, 2004).

Por intermédio de teste de toxicidade utilizando o organismo-teste *D. magna*, verificou-se que um efluente têxtil sintético contendo azo corantes diretos apresentou 100 % de inibição sobre os microcrustáceos em todas as diluições testadas. A toxicidade manteve-se mesmo após tratamento em reator anaeróbico. Porém, após o tratamento aeróbico, a toxicidade foi reduzida. Este teste de toxicidade demonstrou que a degradação anaeróbica de azo corantes gerou metabólitos tóxicos para os microcrustáceos. Como a toxicidade foi eliminada após o tratamento aeróbico, houve um indício de que os produtos que causaram toxicidade aos microcrustáceos foram parcialmente degradados sob condições aeróbicas (SPONZA; IŞIK, 2005).

1.7.4 *Danio rerio*

Uma espécie animal que é reconhecida internacionalmente como adequada para testes ecotoxicológicos é um peixe tropical de água doce, originário da Ásia, o *Danio rerio* Hamilton-Buchanan, 1822 (Pisces, Ordem Cypriniformes, Família Cyprinidae), que é popularmente conhecida como *zebrafish* ou paulistinha (KNIE; LOPES, 2004). Alguns autores referem-se a esta espécie com *Brachidanio rerio*,

porém, esta denominação hoje não é mais aceita (INTEGRATED TAXONOMIC INFORMATION SYSTEM – ITIS, 2005).

Estes peixes são bentopelágicos onívoros e muito ativos, vivem em média três anos e possuem um comprimento máximo de 5 cm (KNIE; LOPES, 2004). As fêmeas são maiores do que os machos, a espécie pode ser encontrada em diversos habitats, desde rios e riachos com águas calmas até águas paradas, como campos de cultivo de arroz (FISH BASE, 2005).

D. rerio tem sido amplamente empregado em diversos países como organismo bioindicador em função de estar comercialmente disponível; apresentar cultivo e manutenção em laboratório relativamente simples; suportar grandes variações de temperatura, de pH e dureza da água; além de demonstrar sensibilidade satisfatória para um grande leque de substâncias químicas (KNIE; LOPES, 2004).

1.7.5 *Allium cepa*

A espécie *Allium cepa* Lineu foi classificada anteriormente dentro da Família Liliaceae (BRASIL, 1992) e atualmente está incluída na Família Alliaceae, dentro da Ordem Liliales. Esta espécie tem sido utilizada em ensaios toxicológicos que consistem em expôr a base de bulbos às substâncias poluentes ou aos efluentes para se efetuar o monitoramento da toxicidade dos mesmos (CHANDRA et al., 2005; FISKESJO, 1988, 1993).

O teste de alongamento de raízes é simples, rápido, de fácil execução e tem sido aplicado no biomonitoramento da genotoxicidade causada por contaminantes ambientais (GRANT, 1982; CHANDRA et al., 2005), assim como para a verificação dos efeitos tóxicos causados pela exposição de meristemas das raízes dos bulbos ao choro de resíduos de curtumes (CHANDRA; GUPTA, 2002).

Por outro lado, através da exposição de sementes pode-se verificar a fitotoxicidade de substâncias ou de efluentes. Este método consiste na exposição de sementes, em substrato sólido umedecido com a substância que se deseja testar para verificar a porcentagem de germinação, bem como o vigor no crescimento da raiz das plântulas (TÍQUIA; TAM; HODGKISS, 1996). Trata-se de uma técnica simples, rápida, segura e de fácil reprodução, além de permitir a avaliação de danos causados por substâncias tóxicas (WANG; KETURY, 1990).

1.8 Biomarcadores no biomonitoramento

Além de testes de avaliação toxicológica aguda, obrigatórios pela legislação, fazem-se necessários alguns outros ensaios biológicos que permitem uma avaliação mais detalhada e específica da real contaminação ambiental e dos potenciais riscos para a população de organismos expostos. O monitoramento biológico de exposição permite que sejam estabelecidos limites ou níveis de ação, os quais devem ser determinados com base nas relações de resposta entre a concentração/dose e os efeitos observáveis nos ensaios. Dentro deste contexto os biomarcadores de

exposição e de efeito são ferramentas úteis no monitoramento ambiental (MUTTI, 1999).

Desta forma, o monitoramento biológico ou biomonitoramento envolve a mensuração periódica de biomarcador de exposição. Este pode ser definido como “uma substância exógena, seu metabólito ou o produto da interação entre um agente xenobiótico e alguma molécula ou célula alvo, que pode ser medido em um compartimento situado no organismo” (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1987).

Portanto, este tipo de biomonitoramento permite verificar após a exposição às substâncias químicas o nível de absorção, de transformação em metabólitos ativos e de acumulação em um órgão, tecido ou célula-alvo (MUTTI, 1999), ou seja, os biomarcadores de exposição permitem uma estimativa da concentração interna ou a biodisponibilidade de um xenobiótico particular ou do seu metabólito em um organismo. São exemplos de biomarcadores de exposição: a indução do sistema enzimático citocromo CYP450, determinada pela exposição aos hidrocarbonetos aromáticos planares; os aumentos nos níveis de vitelogenina, resultantes da estimulação por fitoestrógenos presentes em efluentes de indústrias de papel e celulose; e a formação de aductos específicos de DNA, pela exposição aos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) (SCHLENK, 1999).

Também devem ser estudados os biomarcadores de efeito, que foram definidos como “uma substância fisiológica ou outra alteração dentro de um organismo, que possa ser mensurável e que, dependendo de sua magnitude, possa ser reconhecida como um risco real ou potencial de prejuízo à saúde ou de causar doença” (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1989; MUTTI, 1999). São considerados biomarcadores de efeito a fragmentação do DNA; as aberrações

cromossômicas; a ocorrência de micronúcleos e a lipoperoxidação além de outros índices de estresse oxidativo (ADAMS et al., 1989).

Espera-se que a verificação destes biomarcadores torne possível o reconhecimento das modificações iniciais que precedem danos progressivos estruturais ou funcionais ao nível molecular, celular e tecidual. Esta estratégia baseia-se na identificação de eventos bioquímicos precoces e reversíveis, que sejam sensíveis e também indicadores de exposição específicos (MUTTI, 1999; SILBERGELD, 1993).

Como os biomarcadores podem detectar precocemente efeitos adversos de agentes tóxicos e, principalmente, tendo em vista que muitos efeitos subletais podem ocorrer sem necessariamente resultar na morte do organismo, tornou-se relevante utilizar ensaios subletais (ALMEIDA et al., 2002).

Tal detecção precoce de efeitos adversos pode ser possível através da realização de ensaios subletais nos quais podem ser verificados danos ao DNA através do teste cometa (LEMOS et al., 2005).

1.8.1 Teste cometa

O teste cometa é um método confiável, relativamente barato e de fácil execução (LEMOS et al., 2005). Pode ser efetuado utilizando-se diferentes tecidos, porém, pela praticidade utilizam-se os eritrócitos (LEMOS et al., 2005; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

O teste cometa permite também uma clara distinção entre a variabilidade natural e aquela induzida pelo estresse causado pelo contaminante que apresentar genotoxicidade (LEMOS et al., 2005). O dano genotóxico verificado em cada célula é detectado através da extensão da migração de fragmentos de DNA submetidos a um campo elétrico. Estes fragmentos são quebras simples ou duplas no DNA, causadas pelas substâncias genotóxicas. Como apresentam tamanhos distintos, formam uma imagem que lembra um cometa - daí a denominação do teste. O comprimento da cauda reflete a extensão do dano causado ao núcleo da célula e pode ser comparado com uma célula intacta (DEVENTER, 1996; GONTIJO; TICE, 2003).

Este é um método citogenético no qual também pode ser empregado o corante nitrato de prata que permite uso de microscopia óptica convencional, apresentando um nível de sensibilidade similar ao método empregando brometo de etídeo. Este método requer o uso de microscopia de fluorescência, além de cuidados muito maiores com a segurança química por tratar-se de substância genotóxica (NADIN; VARGAS-ROIG; CIOCCA, 2001).

É importante observar que os resultados do teste cometa são concordantes com aqueles obtidos em outros testes de genotoxicidade nos quais é possível verificar a indução de dano ao DNA, como os testes de aberrações cromossômicas e teste de micronúcleos (MONTEIH; VANSTONE, 1995; LEMOS et al., 2005).

Através do teste cometa pode-se efetuar a mensuração de quebras simples ou duplas, assim como sítios álcali lábeis no DNA. Já o teste de micronúcleos elucida danos citogenéticos ao detectar alterações secundárias no DNA, como as deleções cromossômicas (DIEKMANN et al., 2004).

1.8.2 Teste de micronúcleos

Em peixes, dentre os biomarcadores de genotoxicidade, destaca-se o teste de micronúcleos (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

O teste de micronúcleos pode ser aplicado em qualquer população de células que esteja em divisão celular. Este ensaio foi utilizado no monitoramento do potencial genotóxico de diferentes substâncias e de misturas complexas, como efluentes têxteis, tanto em laboratório quanto em campo (BUENO, 2000; ÇAVAS; ERGENE-GÖZÜKARA, 2003, 2005; ODEIGAH; OSANYIPEJU, 1995).

Bueno (2000) efetuou um biomonitoramento *in situ* com peixes marinhos (*Geophagus brasiliensis*) não tendo encontrado diferenças significativas nos animais coletados em sítio referência e nos animais do local poluído utilizando como biomarcador citogenético a presença de micronúcleos em células.

Knopper e colaboradores (2005) encontraram diferenças significativas entre as freqüências de micronúcleos de peixes da espécie *Microtus pennsylvanicus*, que foram coletados em sítio referência e em rios contaminados com pesticidas organoclorados e metais como mercúrio, cádmio e chumbo.

Juntamente com a ocorrência de micronúcleos, a lipoperoxidação é considerada como um exemplo de biomarcador de efeito (ADAMS et al., 1989).

1.8.3 Lipoperoxidação de membranas celulares

A lipoperoxidação é um processo induzido por espécies reativas de oxigênio (EROs), que podem reagir com biomoléculas tais como proteínas, lipídios, ácidos nucleicos e carboidratos (MEAGHER; FITZGERALD, 2000). Nas membranas celulares, além das proteínas, existem fosfolipídios em abundância. Estes compostos, principalmente os ácidos graxos poliinsaturados, são alvos endógenos facilmente acessíveis ao ataque dos radicais livres formados no metabolismo celular. Ao longo deste processo formam-se novos radicais livres e, conseqüentemente, a lipoperoxidação pode levar à formação de radicais livres em cadeia (ZWART et al., 1999).

Em função das conseqüências resultantes deste processo de ataque oxidativo para o metabolismo celular e, principalmente pela precisão da resposta, a lipoperoxidação foi considerada como um biomarcador adequado para determinar os danos oxidativos às membranas (LIVINGSTONE, 2001). Benassi (2004) relacionou a toxicidade de efluentes ricos em metais com a indução do estresse oxidativo em tilápias (*Oreochromis niloticus*). Este, por sua vez, causou a lipoperoxidação das membranas celulares que foi verificada através da determinação das espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS), e também levou às alterações dos níveis das defesas enzimáticas e não enzimáticas.

1.8.4 Defesas antioxidantes

A toxicidade de poluentes pode ser determinada através da verificação de alterações nas defesas antioxidantes. Estas representam um mecanismo de defesa celular para combater a toxicidade das EROs (WILHELM FILHO, 1996).

A glutathiona (GSH) é um importante antioxidante que neutraliza diretamente os metabólitos reativos. Trata-se do principal tiol não protéico associado a uma variedade de funções celulares, entre as quais a detoxificação através da conjugação com intermediários eletrofílicos, principalmente via atividade da enzima glutathiona S-transferase (GST) na fase II da biotransformação (GALLAGHER; DI GIULIO, 1992). Este tiol também apresenta a atividade “scavenger” de radicais livres, é cofator de enzimas essenciais e atua na defesa contra moléculas oxidantes e xenobióticos potencialmente perigosos (PEÑA et al., 2000).

O sistema de defesa antioxidante também conta com outras substâncias exógenas tais como α -tocoferol (principal componente da vitamina E), β -caroteno, ascorbato (vitamina C), além das endógenas como a glutathiona (GSH) e o ácido úrico (urato) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1998).

Entre os biomarcadores associados com as defesas antioxidantes enzimáticas, merecem destaque as enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathiona S-transferase (GST) e catalase (CAT), entre outras (PENG; JONES; WATSON, 2000).

A superóxido dismutase (SOD) é uma metaloenzima considerada uma das mais importantes defesas antioxidantes na neutralização das EROs, pois são

responsáveis pela conversão do $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 e O_2 (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1998).

Outra importante enzima que apresenta atividade antioxidante é a catalase (CAT) que está presente na maioria das células eucarióticas e procarióticas aeróbias onde converte o peróxido de hidrogênio em água. Nos animais, embora esta enzima esteja presente na maioria dos órgãos, está concentrada principalmente no fígado e nos eritrócitos. Estruturalmente, a CAT é composta de quatro subunidades protéicas, cada uma contendo um grupo heme [Fe (III) – protoporfirina] ligado ao sítio ativo. Ligando-se a cada subunidade da enzima encontra-se uma molécula de NADPH. Estas atuam na estabilidade da estrutura enzimática (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1998).

As participações das enzimas SOD e CAT são importantes na neutralização das EROs, como parte da resposta de proteção contra o estresse oxidativo (DI GIULIO et al., 1995). A ação das enzimas SOD e CAT pode ser observada nas equações apresentadas na figura 8.

Os tecidos e órgãos podem apresentar diferentes níveis de defesa antioxidativa (WILHELM FILHO; GIULIVI; BOVERIS, 1993). Estes níveis dependem do organismo e das circunstâncias envolvidas como hábitos, idade, capacidade de termorregulação, habitat, taxa metabólica e estado nutricional (WILHELM FILHO et al., 2001).

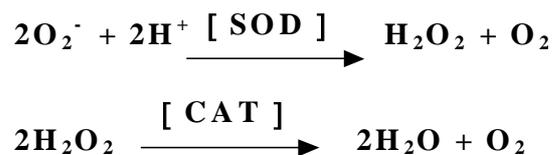


Figura 8 – Esquema com equações das reações de neutralização das EROs, nas quais participam as enzimas SOD e CAT (Adaptada de DI GIULIO et al., 1995).

Vários trabalhos já publicados sobre o uso dos biomarcadores no diagnóstico de agentes poluidores, bem como no acompanhamento dos processos de remediação e tratamento de efluentes, revelaram que os mesmos são ferramentas bastante úteis e sensíveis. Desta forma, a determinação dos níveis de TBARS e GSH, do dano ao DNA pelo teste cometa e a verificação da indução de enzimas citoprotetivas (SOD, CAT e GST), são fundamentais para a avaliação dos riscos associados ao lançamento de substâncias ou de efluentes no ambiente (ANGUIANO; MONTAGNA; PÉCHEN DE D'ANGELO, 2003; BENASSI, 2004; LIMA et al., 2006; WILHELM FILHO et al., 2001).

1.9 Novas alternativas de remoção de cor de corantes e de efluentes têxteis

Entre as formas de remoção de cor atualmente em estudo destacam-se os processos físicos, que se baseiam fundamentalmente na sorção (absorção e/ou adsorção) dos corantes em materiais sorventes/adsorventes, sendo apontados como alternativas no processo de descoloração de efluentes (SALEN, 1995; KIMURA, 2001).

A adsorção é um dos processos físicos de tratamento mais utilizado para a remoção de cor dos efluentes e corantes têxteis. Entre os materiais empregados como adsorventes, o carvão ativo é um dos mais utilizados. Na atualidade, vários materiais adsorventes alternativos têm sido empregados com sucesso, como no caso da bentonita, que promoveu a remoção de cor de corantes catiônicos (TAHIR; RAUF, *in press*), ou na remoção de cor do corante verde malaquita, através de resíduos do processamento de juta (BANERJEE; DASTIDAR, 2005).

Em geral, nas estações de tratamento de efluentes têxteis são empregados sistemas físico-químicos de coagulação e precipitação, seguidos de tratamento biológico através de sistemas de lodos ativados (KUNZ et al., 2002). Nestes tratamentos são usados agentes coagulantes que, através de interações químicas e físicas, proporcionam a remoção de moléculas e de materiais em suspensão fina na água através da formação de partículas maiores (flocos) que precipitam, podendo então ser removidas por sedimentação e/ou filtração (SPINELLI, 2001). Alguns sistemas utilizam os coagulantes inorgânicos (sulfato de alumínio e cloreto férrico), ou os coagulantes orgânicos não biodegradáveis como polieletrólitos sintéticos (SANIN, 1997), ou ainda coagulantes orgânicos biodegradáveis como o polieletrólito quitosana (QTS), no qual o fenômeno de sorção (adsorção ou absorção) é o responsável pela remoção dos compostos presentes em efluentes têxteis (KIMURA, 2001).

1.9.1 Uso de polieletrólitos em processos de adsorção

O uso de polieletrólitos no tratamento físico-químico tradicional, juntamente com o sulfato de alumínio e resina, tem como objetivo promover a adsorção das partículas que conferem cor ao efluente pelo polieletrólito, formando flocos que, após serem direcionados para o decantador físico-químico, constituem a massa sólida do decantador. Esta é lançada em um tanque de mistura, com adição de cal para posterior passagem pelo filtro prensa e, no final, o lodo úmido será descartado em aterro industrial (BASTIAN; SANTOS; FERRARI, 2001).

1.9.1.1 Uso de quitosana em processos de adsorção

Considerado como uma nova alternativa biotecnológica, o uso de quitosana no tratamento de efluentes industriais contendo íons metálicos baseia-se na capacidade do biopolímero formar complexos com os metais Cu (II), Cd (II), Ni (II), Pb (II) e Zn (II) (MUZZARELLI; WECKX; FILIPPINI, 1989; FÁVERE, 1994; VARMA; DESHPANDE; KENNEDY, 2004). Este biopolímero é capaz também de adsorver os corantes, o que permite a remoção de cores de efluentes provenientes de diferentes etapas do processo têxtil (KIMURA, 2001).

A quitosana pode ser obtida quimicamente através da desacetilação da quitina (Figura 9) em solução aquosa alcalina. Este polímero é reconhecidamente

não tóxico, além de não apresentar odor, ser biocompatível com tecidos animais e enzimaticamente biodegradável (ZONG et al., 2000).

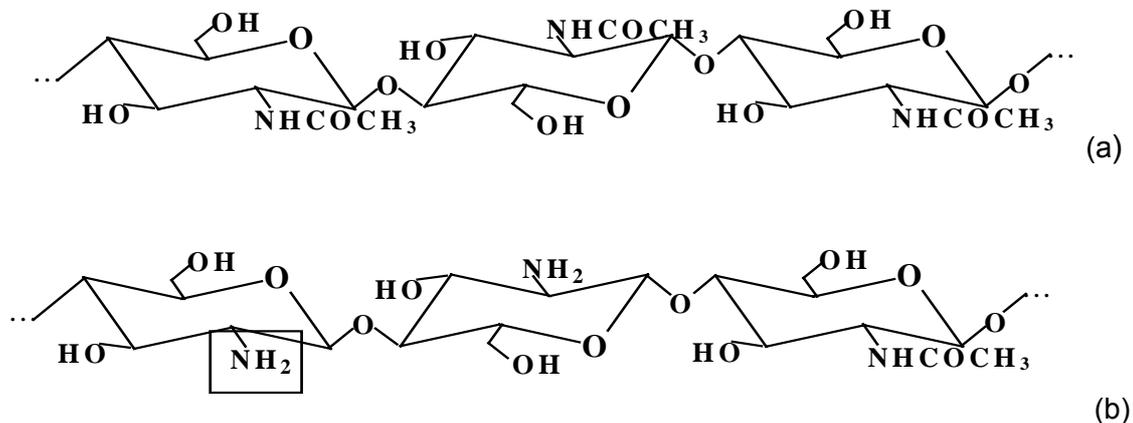


Figura 9 – Estrutura química dos biopolímeros quitina (a) e da quitosana (b) na qual o grupo amino ($-NH_2$) está destacado (Fonte: KIMURA, 2001).

A quitosana apresenta maior capacidade de adsorção em comparação com a quitina, seu precursor de origem natural. Isto decorre da presença na quitosana de um grande percentual de grupos amino livres, expostos durante o processo de desacetilação (ONSOYEN; SKAUGRUD, 1990). Este polímero é solúvel em ácidos orgânicos, tais como ácido acético, ácido fórmico, ácido láctico, entre outros. Porém, é insolúvel em ácido sulfúrico (VARMA; DESHPANDE; KENNEDY, 2004).

O potencial de aplicações biotecnológicas da quitosana pode ser estimado quando se considera a versatilidade físico-química desse polímero natural, isto se deve ao fato deste material ser facilmente modificado fisicamente. Podem ser obtidas inúmeras formulações com várias possibilidades de aplicações da quitina e da quitosana. A partir de ambas é possível serem obtidos fibras, filmes, géis, membranas, pó, nanopartículas, cápsulas, microcápsulas e microesferas para serem

aplicados nos mais diversos campos (KIMURA, 2001; KUMAR, 2000; RHAZI et al., 2002; VALENTINI et al., 2000). Podem ser empregadas na remoção de metais de efluentes (BODDU et al., 2003), bem como na adsorção de corantes aniônicos (CHIOU; HO; LI, 2004), corantes catiônicos (CHAO et al., 2004) ou corantes têxteis (KIMURA et al., 2001).

Embora diferentes formas para o tratamento e remediação de efluentes têxteis tenham sido apresentadas e continuem sendo sugeridas como formas alternativas ou combinadas para efetivamente remover compostos químicos, a maioria dos químicos especializados nos processos têxteis, não têm efetuado paralelamente um estudo da toxicidade dos corantes (BAE; FREEMAN, *in press*). Este fato torna-se particularmente importante quando se tem em mente que a exposição aguda ou crônica de organismos pode levar a efeitos letais e subletais (LIMA et al., 2006).

Ressaltando neste trabalho o enfoque biotecnológico, o mesmo foi desenvolvido de maneira integrativa, dentro da definição do termo biotecnologia, onde está explícita a utilização de sistemas biológicos em processos técnicos ou industriais que, por sua vez, implica na integração de diferentes áreas como a bioquímica, a química e a biologia, de modo a desenvolver o potencial total de cada sistema. Este trabalho aponta os benefícios do uso de biopolímeros, bioindicadores e de biomarcadores como ferramentas biotecnológicas em processo de tratamento de efluentes industriais.

Desta forma, o presente trabalho teve como proposta a avaliação do potencial remediador do polímero biodegradável quitosana sobre o efluente de indústria têxtil, através da realização de ensaios ecotoxicológicos com bioindicadores

aquáticos e de ensaios toxicológicos com vegetais para determinar os possíveis efeitos deletérios associados aos efluentes.

Por outro lado, buscou-se também demonstrar as vantagens do uso de biomarcadores enzimáticos, de estresse oxidativo e citogenéticos, como ferramentas efetivas na avaliação da capacidade de remediação da quitosana sobre o efluente têxtil, levando em consideração que os parâmetros físico-químicos não fornecem informações suficientes para tal avaliação. Além disso, como complemento, propôs-se a redução do número de etapas e de materiais no processo de tratamento do efluente.

Portanto, esta pesquisa representa um estudo avaliativo (preliminar) da eficácia na remediação de efluente proveniente da indústria têxtil utilizando alguns bioindicadores e biomarcadores de efeito e exposição.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Avaliar a capacidade de remediação de efluentes de uma indústria têxtil por quitosana comparativamente àquela realizada através de processos microbiológicos e físico-químicos convencionais, utilizando diferentes bioindicadores e biomarcadores de exposição e efeito.

2.2 Objetivos Específicos

- Selecionar a melhor formulação para remediação de efluente têxtil com quitosana.
- Efetuar, em caráter preliminar, uma avaliação físico-química dos efluentes não remediados e remediados.
- Avaliar a toxicidade aguda dos efluentes não remediados e remediados, utilizando os bioindicadores *Vibrio fischeri*, *Artemia* sp e *Daphnia magna*.
- Avaliar a toxicidade subcrônica dos efluentes não remediados e remediados, utilizando sementes e bulbos de *Allium cepa*.
- Avaliar a toxicidade aguda e subcrônica de efluentes não remediados e remediados, utilizando o peixe *Danio rerio*.
- Avaliar a toxicidade subcrônica de efluentes não remediados e remediados, utilizando biomarcadores de estresse oxidativo em *D. rerio*.
- Avaliar a genotoxicidade de efluentes não remediados e remediados, utilizando teste cometa e micronúcleos em *D. rerio*.

3 METODOLOGIA

3.1 Considerações Gerais

O presente trabalho foi realizado em duas etapas:

- Etapa 1: seleção da formulação da quitosana para a remediação de efluente têxtil.
- Etapa 2: remediação do efluente têxtil com a quitosana selecionada, e monitoramento da remediação.

3.2. Materiais e Equipamentos

3.2.1 Reagentes gerais

Os reagentes: hidroxitolueno butilado (BHT); 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), 5,5'-ditiobis-2-ácido nitrobenzóico (DTNB), glutathiona reduzida (GSH), glicina, ácido tiobarbitúrico (TBA), triton X-100 e tris[hidroximetil] aminometano (TRIS), foram adquiridos junto à Sigma Chemical Co. (St. Louis, U.S.A.). O tampão fosfato com soro bovino fetal (PBS livre de Ca^{2+} e Mg^{2+}), as agaroses de ponto de fusão baixo (LMPA - "low melting point agarose") e de ponto de fusão normal (NMPA - "normal melting point agarose"), foram obtidos da Gibco BRL (New York, USA); ácido tricloroacético (TCA), citrato de sódio tribásico, fosfato de potássio dibásico, butanol, dicromato de potássio, peróxido de hidrogênio, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), fuccina e verde malaquita, foram obtidos junto à

Vetec (São Paulo, Brasil); fosfato de sódio monobásico e fosfato de sódio dissódico junto à Merck (São Paulo, Brasil). Todos os demais reagentes utilizados nos ensaios foram de grau analítico.

A quitosana pulverizada utilizada como agente remediador no presente estudo foi obtida junto à Empresa Purifarma (São Paulo, Brasil).

3.2.2 Equipamentos

Os principais equipamentos utilizados na realização deste trabalho são abaixo listados:

Agitador magnético (Velp Scientifica)

Bomba peristáltica (Ismatec)

Centrífuga (Eppendorf)

Centrífuga (FANEM)

Condutivímetro (Mettler Toledo, MC 226)

Espectrofotômetro UV-Vis (TECHCOMP, modelo 8500 II)

Espectrômetro de absorção atômica (Analyst 100 Perkin Elmer) com forno de grafite (HGA 800 Perkin Elmer)

Espectrômetro de absorção atômica (VARIAN Spectra - AA-50)

Fonte de eletroforese horizontal (Consort, E844, 400 V – 400 mA)

Homogenizador Potter-Elvehjem (Glas-Col, modelo GKH)

Incubadora com agitação termostaticada minishaker (Marconi, MA 832)

Luminômetro (LUMISTOX[®], DR. LANGE)

Luxímetro digital (Lutron, LX- 101)

Máquina fotográfica digital (Sony, Cyber-Shot; 3,2 megapixels)

Microscópio de campo invertido (Leica)

Microscópio eletrônico de varredura (modelo Philips XL 30)

Microscópio estereoscópico binocular (PZO)

Microscópio óptico (Nikon)

Oxímetro digital (Schott, modelo Gerate GMBH)

PHmetro (Micronal)

Paquímetro (Zaas Precision)

Regulador de fotoperíodo (Kienzle)

Titulador automático (Schott Geräte, modelo T 80/20)

Vórtex (Marconi, modelo MA 162)

3.3 Coleta das amostras de efluentes

Para a realização dos ensaios do presente trabalho, foram coletadas amostras de efluentes de uma indústria têxtil situada no município de Blumenau/SC, onde são produzidos tecidos de algodão. Foi coletada uma única amostra de efluente têxtil bruto, não remediado, na entrada (100 L) e outra amostra na saída (100 L) da estação de tratamento de efluentes da indústria têxtil. As amostras do efluente têxtil não remediado (EB) e do remediado na estação de tratamento de efluentes da empresa (ETE) foram acondicionadas em frascos de polietileno, e congeladas até a realização dos ensaios.

3.4 Determinação do grau de desacetilação e morfologia da quitosana, preparação das microesferas, solução de quitosana como agente de coagulação e de quitosana pulverizada

3.4.1 Grau de desacetilação e morfologia

O grau de desacetilação da quitosana (% GD) ou a porcentagem de grupos amino foi determinado por titulação condutimétrica empregando o condutivímetro digital e um titulador automático, conforme o método proposto por Raymond; Morin e Marchessault (1993). Uma amostra de 200 mg de quitosana foi transferida para um béquer de 600 mL, contendo 450 mL de solução de NaCl (1mmol.L^{-1}) e 5,0 mL de HCl ($1,0\text{ mol.L}^{-1}$). Após a dissolução do polímero, a titulação foi conduzida com a adição de 0,5 mL de NaOH ($0,1\text{ mol.L}^{-1}$) a cada 20 segundos, sob atmosfera de nitrogênio. Esta titulação foi repetida por mais duas vezes.

Esta determinação foi efetuada no Laboratório QUITTECH (Grupo de Pesquisa em Quitina e Quitosana e Aplicações Tecnológicas) do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), coordenado pelos professores Valfredo T. de Fávere e Mauro C. M. Laranjeira.

A morfologia da superfície externa das partículas de quitosana foi analisada empregando microscópio eletrônico de varredura (MEV). Para tanto, as amostras de quitosana foram colocadas em suportes (estabes) do MEV, recobertas com ouro; e micrografadas (tensão de 15 kV, sem padrão), conforme Kimura et al. (1999). Este

procedimento foi realizado no Laboratório de Materiais (LABMAT) do Centro Tecnológico da UFSC.

3.4.2 Preparação das microesferas de quitosana (QTS1)

As microesferas de quitosana foram obtidas pelo método de inversão de fases (STOLBERG et al., 1999). Uma solução de quitosana a 3 % (m/v) foi preparada dissolvendo-se 3 g de quitosana em 100 mL de ácido acético (CH_3COOH) a 5 % (m/v). A solução viscosa obtida foi gotejada, com auxílio de uma bomba peristáltica acoplada, em um banho contendo solução de NaOH ($2,0 \text{ mol.L}^{-1}$). As microesferas gelificadas foram lavadas com água destilada para eliminar o NaOH residual, até meio neutro, e secas a 60°C em estufa até peso constante.

A morfologia da microesfera foi analisada de acordo com Kimura (2001) empregando um microscópio eletrônico de varredura do Laboratório de Materiais (LABMAT), do Centro Tecnológico da UFSC. O diâmetro médio das microesferas foi determinado a partir da fotomicrografia de vinte microesferas reticuladas com glutaraldeído 2,5 % (m/v) e lavadas com água destilada e com acetona, para retirar o excesso de material reticulante, através da medida dos diâmetros dos eixos vertical e horizontal de cada partícula (Figura 10), esta determinação foi efetuada no Laboratório QUITTECH (Grupo de Pesquisa em Quitina e Quitosana e Aplicações Tecnológicas), do Departamento de Química da UFSC.

As microesferas (QTS1) sem reticulação foram utilizadas no procedimento de remediação do efluente têxtil em estudo.

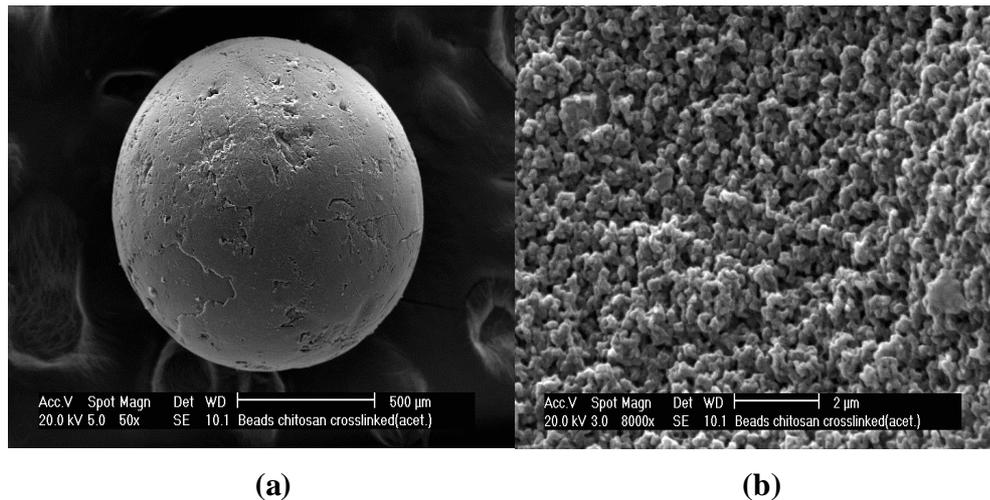


Figura 10 – Fotomicrografia obtida em microscópio eletrônico de varredura de microsfera de quitosana. (a) morfologia da superfície externa da microsfera (50 X), (b) detalhe da superfície (8000 X) (imagens gentilmente cedidas por Dr^a. Irene Y. Kimura e Dr. Valfredo T. de Fávere).

3.4.3 Preparação da solução de quitosana em ácido acético (QTS2)

A formulação de quitosana solubilizada em ácido acético (QTS2) foi preparada utilizando um agitador magnético e um béquer, dentro do qual se acrescentou 1 g de quitosana solubilizada em 100 mL de CH_3COOH a 1 % (v/v), por 1 h. O pH da solução foi corrigido com solução de CaO a 1 % (m/v), até a neutralidade. Esta formulação de quitosana foi utilizada como coagulante no procedimento de remediação do efluente EB.

3.4.4 Quitosana pulverizada (QTS3)

A quitosana pulverizada foi utilizada sem modificações, sendo acrescentada diretamente ao efluente bruto, segundo formulações apresentadas no item 3.5.1.3.

3.5 Remediação dos efluentes

3.5.1 Etapa 1 – Seleção de formulação de quitosana para remediação de efluente têxtil

Para a seleção da melhor formulação de quitosana foram realizados ensaios preliminares com QTS1, QTS2 e QTS3.

3.5.1.1 Remediação com microsferas de quitosana (QTS1)

A remediação do efluente EB foi realizada conforme metodologia proposta por Kimura (2001), com modificações. Eluiu-se o efluente EB através de uma coluna cromatográfica de vidro com altura de 11 cm, diâmetro de 1,2 cm e empacotada com 2,1 g de QTS1. Uma bomba peristáltica foi acoplada ao sistema e manteve-se constante o fluxo do efluente que passava pela coluna ($1,1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$).

O pH do efluente remediado por QTS1 foi monitorado durante todo o processo através de um eletrodo colocado logo após a saída do efluente pela coluna.

A determinação da cor em solução no efluente EB e remediado foi realizada através de leitura espectrofotométrica da amostra, sem correção do pH, tendo-se obtido o valor de absorvância máxima em 517 nm. A porcentagem de remoção da cor foi calculada a partir da equação (1):

$$\text{Remoção da cor (\%)} = 100 - \frac{\text{Abs QTS1} \times 100}{\text{Abs EB}} \quad (1)$$

3.5.1.2 Remediação do efluente por coagulação/floculação da quitosana (QTS2)

A remediação do efluente EB foi realizada conforme metodologia proposta por Kimura (2001), com modificações. O efluente EB (50 mL) foi adicionado em um erlenmeyer contendo 100 mL da solução de QTS2, preparada com solução de ácido acético 1 % e 1 g de quitosana pulverizada, a correção do pH até a neutralidade foi efetuada com óxido de cálcio a 1 % para a precipitação do polímero.

O conjunto foi mantido em rotação máxima por 10 min, à temperatura ambiente (25 °C). Desligou-se o agitador magnético e aguardou-se 30 min para sedimentação, em seguida separou-se o sobrenadante por centrifugação (2000 g, 5 min).

A determinação da cor em solução no efluente EB e remediado com QTS2 foi realizada através de leitura espectrofotométrica da amostra em 517 nm. A porcentagem de remoção da cor foi calculada a partir da equação (2):

$$\text{Remoção da cor (\%)} = 100 - \frac{\text{Abs QTS2} \times 100}{\text{Abs EB}} \quad (2)$$

3.5.1.3 Remediação do efluente por adsorção em quitosana pulverizada (QTS3)

Para a seleção da formulação de quitosana pulverizada foram realizados ensaios em batelada, acrescentando-se 20 mL do efluente têxtil EB em erlenmeyeres nos quais, em seguida, foram adicionadas diferentes massas de quitosana pulverizada (0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 e 1,0 g) denominadas como QTS_A até QTS_F. Os conjuntos foram mantidos em incubação sob agitação a 25 °C e 200 rpm, sem ajuste de pH, por 24 h. Alíquotas foram centrifugadas (4000 g, 15 min) e efetuou-se a leitura da absorbância dos efluentes remediados obtidos em espectrofotômetro a 517 nm.

Calculou-se a porcentagem de remoção da cor conforme equação (3):

$$\text{Remoção da cor (\%)} = 100 - \frac{\text{Abs QTS}_{A-G} \times 100}{\text{Abs EB}} \quad (3)$$

Após a verificação da formulação de quitosana que apresentou maior porcentagem de remoção de cor, com menor consumo de quitosana, esta foi selecionada para a remediação do efluente EB e recebeu a denominação QTS3.

Para a remediação do EB, foram acrescentados 250 mL deste em erlenmeyer, contendo 3,75 g de quitosana pulverizada, na mesma proporção utilizada para obter QTS3. A remediação foi efetuada em batelada, o conjunto foi mantido em incubação sob agitação a 25 °C e 200 rpm, sem ajuste de pH, por 24 h. Alíquotas foram centrifugadas (4000 g, 15 min) e efetuou-se a leitura da absorbância dos efluentes remediados obtidos em espectrofotômetro a 517 nm.

3.5.2 Análises físico-químicas dos efluentes não remediados e remediados

3.5.2.1 Determinação do pH

O pH foi medido a partir de alíquotas retiradas dos efluentes EB, ETE, QTS1, QTS2 e QTS3. Para a leitura, por potenciometria, foi utilizado um pHmetro, previamente calibrado com soluções padrões de pH 4,0 e 7,0.

3.5.2.2 Determinação da concentração de metais

A concentração de metais presentes nos efluentes estudados foi determinada por espectrometria de absorção atômica, de acordo com American Public Health Association (APHA) (1998). Para os metais chumbo e cádmio as determinações foram realizadas por meio de espectrômetro de absorção atômica,

acoplado com forno de grafite. Estes ensaios foram realizados na Central de Análises do Departamento de Química, da UFSC.

3.5.2.3 Determinação da condutividade

Para determinação da condutividade, foram utilizados 50 mL de água de torneira aerada, e dos efluentes EB, ETE e QTS3, em 100 % de concentração. As amostras foram mantidas em incubação com agitação termostatizada até atingirem a temperatura de 25 °C e imediatamente em seguida foi medida a condutividade, nesta mesma temperatura com um condutímetro digital calibrado com solução padrão de KCl ($0,745 \text{ g.L}^{-1}$) para condutância de $1,42 \text{ mS. cm}^{-1}$ a 25 °C.

3.5.2.4 Determinação da dureza

Para determinação da dureza foi utilizado o método de titulometria. Foi utilizado um volume de 20 mL de água de torneira aerada e dos efluentes EB, ETE, e QTS3 em 100 e 20 % de concentração, para realizar titulação com EDTA (0,02 M) até a mudança de cor de vermelho-vinho para azul, utilizando-se o indicador eriocromo-T. Antes de gotejar o indicador, para impedir que este fosse bloqueado pelas pequenas quantidades de ferro presentes na amostra, foram acrescentados 10 mL de tampão $\text{NH}_4\text{Cl} / \text{NH}_4\text{OH}$ (pH 10), conforme Fritz e Schenk Jr. (1969).

Após a adição do tampão, agitou-se a solução, adicionou-se 1 mL de solução Na_2S e 4 gotas do indicador eriocromo-T. Agitou-se o conjunto que adquiriu cor vinho, em seguida procedeu-se à titulação com EDTA até o ponto de viragem para a cor azul, quando foi anotado o volume de EDTA consumido. Para o efluente EB em função da cor que apresentou, foi necessário efetuar-se uma diluição de 10 mL deste em 90 mL de água destilada.

O cálculo da dureza em termos de CaCO_3 (mg.L^{-1}) foi realizado aplicando-se a equação (4):

$$D = \{ [M_{\text{EDTA}} (\text{mmoles/mL}) \times \text{mL}_{\text{EDTA}} \times \text{PM } \text{CaCO}_3 (\text{mg/mmoles})] \text{mL}_{\text{amostra}} \} \times 1000 \text{ mL.L}^{-1} \quad (4)$$

$$D = [(M_{\text{EDTA}} \times \text{mL}_{\text{EDTA}} \times 100,09) / 100 \text{ mL}] \times 1000$$

Onde D = dureza da água em mg de CaCO_3 . L^{-1}

3.6 Avaliação da toxicidade aguda dos efluentes não remediados, e remediados utilizando organismos bioindicadores

3.6.1 Ensaio de toxicidade aguda com *Artemia* sp

Os ensaios de toxicidade aguda estáticos foram realizados conforme método de Meyer et al. (1982), com modificações efetuadas segundo Gomes (1986). Cistos de *Artemia* sp foram incubados por 24 h em solução de sal marinho sintético (30 g. L^{-1}), com aeração e iluminação constantes (500 lux) em sala climatizada mantida a 25 °C. Após a eclosão dos cistos, as larvas foram transferidas para placas de

poliestireno para cultura de células. Em cada poço da placa foi adicionado 2 mL de amostra dos efluentes EB, ETE, QTS1, QTS2 e QTS3 em diferentes diluições (100, 75, 50, 25, 12,5, 6,2, 3,1, e 1,5 %), em solução de sal marinho sintético (30 g.L⁻¹).

O controle negativo com sal marinho sintético (30 g.L⁻¹) e o positivo com dicromato de potássio (1,75 mg.L⁻¹) foram conduzidos paralelamente. Após 24 h de exposição, sem alimentação, a 25 °C e no claro, foi efetuada a contagem do número de larvas imóveis em microscópio de campo invertido e a CE₅₀ foi calculada pela análise probito, através do método matemático Trimmed Spearman-Kärber (HAMILTON et al., 1977), aplicando o software da Burlington Research-Inc. Para cada concentração testada foram realizadas 3 replicatas com 10 larvas em cada.

3.6.2 Ensaio de toxicidade aguda com *Daphnia magna*

Os ensaios de toxicidade aguda com *Daphnia magna* foram realizados de acordo com a norma da ABNT NBR 12713 (ABNT, 2003). Antes da análise da toxicidade dos efluentes, os microcrustáceos passaram por um teste de sensibilidade usando K₂Cr₂O₇ (1,75 mg.L⁻¹), que teve por objetivo avaliar a qualidade do lote das matrizes, conforme verificado por Baptista (2001).

Os ensaios de toxicidade aguda estáticos foram realizados em béqueres de 25 mL, em duplicatas para cada concentração, além dos controles negativos com água de diluição. Em cada béquer foram colocados 10 microcrustáceos jovens, apresentando entre 6 e 24 h de vida. Os efluentes EB, ETE, QTS1, QTS2 e QTS3

foram avaliados em diferentes diluições (100, 50, 25, 12,5 e 6,25 %). Os ensaios foram mantidos a uma temperatura de 20 ± 2 °C em sala climatizada, no escuro e sem alimentação. Após 24 e 48 h de exposição, os organismos imóveis foram contados e a CE_{50} foi calculada pela análise de probito através do método matemático Trimmed Spearman-Kärber (HAMILTON et al., 1977), usando o software da Burlington Research-Inc. Os resultados foram apresentados também em termos de fator de diluição (FD).

Segundo disposto na Portaria nº 17 de 2002, o fator de diluição (FD) “representa a primeira de uma série de diluições de uma amostra na qual não mais se observam efeitos tóxicos agudos aos organismos-teste” (FATMA, 2002).

Estes ensaios foram realizados no Laboratório de Biologia e Biotecnologia de Fungos, do Departamento de Bioquímica da UFSC, coordenado pelo Prof. Dr. Carlos Henrique Lemos Soares.

3.7 Remediação e biomonitoramento dos efluentes

Para a escolha da melhor formulação de quitosana para remediação do efluente têxtil em estudo foram utilizados os seguintes critérios:

- a) Capacidade de remoção de cor do efluente conforme metodologia apresentada nos itens 3.5.1.1, 3.5.1.2 e 3.5.1.3.

- b) Capacidade de redução da toxicidade para os organismos indicadores *Artemia* sp e *D. magna*, conforme metodologia apresentada nos itens 3.6.1 e 3.6.2.

A formulação QTS3 apresentou melhores resultados frente aos critérios acima adotados, tendo desta forma sido selecionada para a continuidade dos ensaios.

3.7.1 Etapa 2 – Remediação e biomonitoramento do efluente têxtil com a quitosana selecionada (QTS3)

3.7.1.1 Remediação com QTS3

A remediação do efluente têxtil foi realizada conforme descrito no item 3.5.1.3, utilizando-se 0,3 g de quitosana pulverizada para cada 20 mL de efluente.

3.7.1.2 Biomonitoramento dos efluentes utilizando ensaios de toxicidade aguda

3.7.1.2.1 Ensaio de toxicidade aguda com *Vibrio fischeri*

Os ensaios de toxicidade aguda empregando *Vibrio fischeri* foram realizados utilizando os efluentes EB, ETE e QTS3 segundo a norma técnica ISO 11348-1 da

International Organization for Standardization (ISO) (1998) e a norma DIN 38412-34 do Deutsches Institut für Normung (DIN) (1993), para determinar a inibição da bioluminescência e cálculo da CE_{50} .

As cepas das bactérias liofilizadas da espécie *V. fischeri* pertencentes ao lote U-013 da coleção da empresa Umwelt, de Blumenau; foram inoculadas em duplicatas ($n=10^6$ unidades formadoras de colônias - UFC) em tubos contendo solução salina (NaCl 2 %), e mantidos a 15 ± 1 °C no termobloco. Imediatamente, efetuou-se a primeira leitura da luminosidade no luminômetro e, em seguida, foi introduzido um volume do efluente testado, de maneira a serem obtidas as diferentes diluições do mesmo. Foi efetuada uma segunda leitura após um período de 30 min e, somente então, foi possível determinar a porcentagem de inibição da bioluminescência e o cálculo da CE_{50} através de software específico Dr. Lange LUMISsoft 4.

Foram analisadas as diluições 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56; 0,78; 0,39; 0,19 % que foram obtidas a partir do efluente EB; as diluições 80; 50; 33,33; 25 % obtidas a partir do efluente ETE; e as diluições 80; 50; 33,33; 25 % a partir de QTS3, em duplicatas.

Foram conduzidos ensaios de controle de sensibilidade das bactérias bioluminescentes (*V. fischeri*) com densidade final da cultura principal 800 UNT (unidades nefelométricas de turbidez), de acordo com norma ISO 11348-3 (ISO, 1998). Para tanto as bactérias foram expostas a Cr^{6+} (na forma de $K_2Cr_2O_7$), a Zn^{2+} (na forma de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$); e a 3,5-diclorofenol 6 mg.L⁻¹. As determinações foram realizadas em duplicatas, com medição após 30 min de exposição. Os ensaios de controle de sensibilidade das cepas forneceram os resultados apresentados na

tabela 3. E os resultados de inibição de luminescência obtidos estão de acordo com os valores estabelecidos nas normas ISO 11348-3 (1998) e DIN 38412 (1993), o que demonstrou a sensibilidade do lote. Estes ensaios foram realizados no Laboratório da UMWELT Ltda Assessoria Ambiental, situado em Blumenau; coordenado pelo Dr. Jörg Zaar, da Universidade Regional de Blumenau (FURB).

Tabela 3 – Ensaio de sensibilidade de bactérias bioluminescentes (*Vibrio fischeri*) expostas a Cr^{6+} (na forma de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), Zn^{2+} (na forma de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), e 3,5-diclorofenol 6 mg.L^{-1} . Determinações realizadas em duplicatas, com medição após 30 min de incubação, densidade final da cultura principal 800 UNT (unidades nefelométricas de turbidez).

Parâmetros	Sensibilidade (%)
Taxa de inibição Cr^{6+} (na forma de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) 4 mg.L^{-1}	23,23
Taxa de inibição Zn^{2+} (na forma de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 25 mg.L^{-1}	67,58
Taxa de inibição 3,5-diclorofenol 6 mg.L^{-1}	48,94

3.7.1.2.2 Ensaio de toxicidade aguda com *Artemia* sp

Os ensaios com *Artemia* sp foram realizados conforme método apresentado no item 3.6.1.

3.7.1.2.3 Ensaio de toxicidade aguda com *Daphnia magna*

Os ensaios com *Daphnia magna* foram realizados conforme método apresentado no item 3.6.2.

3.7.1.2.4 Ensaio de toxicidade aguda com *Danio rerio*, para determinação da dose de não efeito

A espécie de peixe selecionada para os estudos foi o paulistinha ou *zebrafish* (*Danio rerio*), por tratar-se de organismo modelo utilizado em diferentes ensaios toxicológicos, e por apresentar pequeno tamanho corpóreo, mesmo na fase adulta. Foram utilizados apenas animais juvenis de ambos os sexos (peso de $0,22 \pm 0,01$ g e comprimento de $3,35 \pm 0,05$ cm). Os animais foram mantidos em aquários de 40 L dispostos em bancadas durante 15 dias para aclimatação, em condições controladas mantendo-se fotoperíodo de 16 h; com lâmpadas fluorescentes; luminosidade de $172,00 \pm 32,36$ lux; temperatura ambiental de $25 \pm 2^\circ\text{C}$; temperatura da água dos aquários mantida em $21 \pm 1^\circ\text{C}$; pH mantido em $7,0 \pm 0,5$; condutividade $61,65 \pm 2,31$ $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ à 25°C ; dureza de $120,00 \pm 0,00$ de CaCO_3 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$; com aeração constante; oxigênio dissolvido $6,3 \pm 0,1$ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ a $21 \pm 1^\circ\text{C}$; recebendo ração comercial em flocos diariamente (2 vezes ao dia) e náuplios de *Artemia* sp (semanalmente).

Os animais foram divididos aleatoriamente em diferentes grupos de exposição e 6 animais foram transferidos para cada béquer de vidro de 600 mL. Os grupos de animais foram submetidos a ensaios estáticos, nos quais foram expostos a 200 mL dos efluentes EB, ETE e QTS3 nas diluições 100, 50, 30, 20, e 1 %, durante 48 h, de acordo com norma da ABNT NBR 15088 (2004) e norma ISO 7346 (1996), com modificações. Como controle negativo utilizou-se apenas água de torneira sem cloro e aerada.

A utilização dos peixes no presente trabalho foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da UFSC, sob número de cadastro 147/CEUA e protocolo 23080.007332/2002-48.

3.7.1.3 Biomonitoramento dos efluentes utilizando ensaios de toxicidade subcrônica

3.7.1.3.1 Ensaio de toxicidade subcrônica com *Allium cepa*

a) Teste de inibição de germinação de sementes de *Allium cepa*

Os ensaios foram conduzidos com sementes de *Allium cepa* conforme método de “blotter” utilizado por Rodo (2002), obtidas de variedades comerciais (sementes HORTEC, variedade Aurora), e mantidas armazenadas em geladeira, em recipientes vedados.

Foi verificada a viabilidade das sementes através de um ensaio de embebição, sugerido por Piana, Tillmann e Silva (1995). Para tanto, após a quebra de dormência no refrigerador por 12 h, as sementes foram mantidas submersas em água mineral autoclavada por um período de hidratação de 3 h ($n=50$, peso de $0,158 \pm 0,002$ g). Após o período de embebição, as sementes foram transferidas para caixas de germinação (plásticas e transparentes), que foram previamente preparadas utilizando duas folhas de papel toalha dobradas ao meio e uma folha de

papel de filtro; as folhas foram esterilizadas em estufa de secagem e esterilização a 50 °C, por dois dias. Nestas caixas, o papel de filtro foi umedecido com 25 mL de água mineral autoclavada. As caixas contendo as sementes foram mantidas em sala climatizada, nas condições apresentadas na tabela 4 e após 6 e 12 dias, efetuou-se a contagem de sementes germinadas e no 12º dia efetuaram-se as medições das plântulas; sendo as determinações realizadas em triplicatas.

Tabela 4 – Resumo dos requisitos para o ensaio de toxicidade subcrônica com sementes de *Allium cepa* (RODO, 2002).

Requisitos	Espécie <i>Allium cepa</i>
Tipo de ensaio	Estático: 6 – 12 dias
Água de diluição	Água mineral
Volume máximo da solução-teste por gerbox	25 mL
Número mínimo de replicatas por diluição	3
Temperatura	25 ± 2 °C
Fotoperíodo	16 h de luz
Luminosidade	435,6 ± 44,8 lux

As sementes (n=100) utilizadas nos ensaios de inibição subcrônica estáticos atenderam aos requisitos estabelecidos segundo as regras para análise de sementes, apresentadas segundo Brasil (1992). Realizou-se a quebra de dormência mantendo as sementes no refrigerador por 12 h. Foram utilizadas apenas sementes do mesmo lote, as quais foram subdivididas em sublotes (n=100; 0,327 ± 0,003 g), de maneira a obter-se maior uniformidade.

Para a realização destes ensaios, conduzidos de acordo com Piana, Tillmann e Silva (1995) e Rodo (2002), com modificações; foram observados os requisitos apresentados na tabela 4. Foi preparado controle negativo contendo somente água mineral autoclavada e controle positivo com dicromato de potássio

(1,75 mg.L⁻¹). Nos ensaios de germinação das sementes empregaram-se soluções testes diluídas em água mineral, contendo 100 % dos efluentes EB, ETE e QTS3. Para cada diluição e controles foram montadas três replicatas, com n = 100. Após 6 e 12 dias registrou-se o número de sementes que não germinaram. As contagens e a interpretação dos resultados foram realizadas segundo Brasil (1992).

b) Ensaio de inibição do crescimento de plântulas de *Allium cepa*

Para este ensaio subcrônico semiestático foram utilizadas apenas as sementes de *Allium cepa* que germinaram no teste de inibição de germinação e de crescimento de plântulas (Figura 11) anteriormente descrito. Foram verificadas algumas das características que indicam anormalidades no desenvolvimento das plântulas apenas no controle positivo realizado com dicromato de potássio (1,75 mg.L⁻¹) (Figura 12), segundo critérios apresentados em Brasil (1992). Também foram efetuadas medições do comprimento das plântulas com uma régua, após 12 dias, registrou-se o comprimento de 40 plântulas. As contagens e a interpretação dos resultados obtidos foram realizadas segundo Brasil (1992).



Figura 11 – Plântulas de *Allium cepa* com 12 dias, apresentando desenvolvimento normal após cultivo em substrato contendo QTS3 a 100 %.



Figura 12 – Plântulas de *A. cepa* com 12 dias, apresentando desenvolvimento anormal após cultivo em substrato contendo dicromato de potássio ($1,75 \text{ mg.L}^{-1}$) em caixa de germinação.

c) Ensaio de inibição do crescimento de raiz de *Allium cepa*

O teste subcrônico semiestático para verificar a inibição do crescimento de raiz de bulbos de *Allium cepa* foi conduzido de acordo com método de Arambasic,

Bjelic e Subakov (1995), com modificações. Anteriormente ao teste de toxicidade, os bulbos de *A. cepa* foram selecionados através de um pré-teste, onde as raízes velhas foram cuidadosamente removidas e a base dos bulbos foi inserida em tubos do tipo falcon (50 mL) contendo água mineral. Após 3 dias de exposição à temperatura de $25\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ e na ausência de luz direta, o crescimento das raízes foi observado. Apenas os bulbos que apresentaram o mesmo padrão de crescimento durante os 3 dias foram selecionados para os testes usando os efluentes. As raízes crescidas durante o pré-teste foram removidas e os bulbos foram reutilizados após secagem por 5 dias, sob refrigeração.

Nos testes de inibição de crescimento das raízes, a base dos bulbos foi colocada no interior de tubos do tipo falcon (50 mL) contendo os efluentes EB, ETE e QTS3, sem diluição. Para cada efluente foram incubadas 6 cebolas durante 3 dias, os ensaios foram realizados em triplicatas. O diâmetro dos bulbos e o comprimento das maiores raízes foram medidos usando um paquímetro. Os ensaios foram realizados em temperatura ambiente ($25 \pm 2\text{ °C}$) em sala climatizada e no escuro, utilizando como controle negativo bulbos expostos apenas em água mineral e como controle positivo dicromato de potássio ($1,75\text{ mg.L}^{-1}$).

3.7.1.3.2 Ensaio de toxicidade subcrônica com *Danio rerio*

A toxicidade subcrônica dos efluentes foi verificada em *D. rerio* onde foram avaliados os biomarcadores de estresse. Para tanto, os animais foram divididos aleatoriamente em diferentes grupos de exposição de 6 animais e posteriormente

transferidos para cada béquer de vidro de 600 mL, contendo 200 mL de efluente, de acordo com da NBR 15088 (ABNT, 2004) e da norma ISO 7346 (ISO, 1996), com modificações. O primeiro grupo foi exposto a 20 % do efluente EB, o segundo grupo foi exposto a 20 % do efluente ETE, o terceiro grupo foi exposto a 20 % do efluente QTS3 e o último grupo foi mantido apenas em água de torneira aerada sem cloro (controle negativo), com renovação diária dos efluentes.

Todos os ensaios subcrônicos semiestáticos foram realizados em triplicatas, nos quais os peixes foram mantidos em sala climatizada com fotoperíodo de 16 h, com lâmpadas fluorescentes fornecendo uma luminosidade de $172,0 \pm 32,4$ lux; em temperatura ambiente de 25 ± 2 °C, e com temperatura da água nos béqueres de 21 ± 1 °C; em pH 7,0 e sem aeração mecânica.

Após o período de exposição de 7 dias, 6 animais de cada grupo de tratamento foram anestesiados em gelo, pesados e medidos, sendo imediatamente sacrificados através de transecção cefálica. Foi preparado um homogenato do *pool* de 6 peixes para avaliação dos biomarcadores de estresse.

a) Avaliação do dano às membranas celulares através da medida da lipoperoxidação

A avaliação da lipoperoxidação das membranas foi realizada em triplicatas, pela detecção dos seus derivados lipoperóxidos, através de substâncias que reagem como o ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme metodologia proposta por Ohkawa

(1979) e por Bird e Draper (1984) e modificada por Hermes-Lima, Willmore e Storey (1995).

Após o sacrifício, os animais foram colocados imediatamente no gelo e uma pequena porção de cada peixe foi separada. Em seguida as porções foram pesadas em conjunto de maneira a totalizar 100 mg de tecido para a preparação dos homogenatos, obtidos em ácido fosfórico a 1 % (1:5 p/v). A homogenização foi realizada a 4 °C, com cerca de 20 impactos em homogenizador Potter-Elvehjem. Posteriormente, juntou-se 400 µL do homogenato para 400 µL da solução gelada de ácido tiobarbitúrico (TBA) a 1 %; NaOH a 50 mM; hidroxitolueno butilado (BHT) a 0,1 mM e 200 µL de ácido fosfórico a 7 %. A seguir, cada amostra foi incubada a 100 °C por 15 min em banho-maria. As amostras e o branco foram levados então ao freezer por 10 min e, foram acrescentados 1,5 mL de butanol em todos os tubos que foram agitados vigorosamente em vórtex por 10 s e centrifugados (2000 g, 5 min). Alíquotas do sobrenadante foram lidas, espectrofotometricamente a 532 e a 600 nm. Para a leitura do branco substituiu-se a solução de TBA por HCl (3,0 mM).

Foi calculada a concentração de TBARS (nmol.g⁻¹) utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 156 mM⁻¹.cm⁻¹ segundo a equação (5):

$$[\text{TBARS}] = \frac{\text{Amostra } (A_{532} - A_{600}) \times 10^3 \times (4 \times 17)}{156} \quad (5)$$

b) Glutathiona reduzida (GSH)

Amostras do *pool* de 6 peixes inteiros, exceto da região cefálica que removida após transsecção, foram precipitadas com ácido tricloroacético (TCA) 12 % na diluição de 1:5 (p/v) e homogeneizadas com cerca de 20 impactos em um homogeneizador Potter-Elvehjem. Imediatamente após centrifugação (5000 g, 5 min), foi realizada a determinação de GSH nos sobrenadantes obtidos. A concentração de pequenos tióis foi avaliada segundo metodologia proposta por Beutler, Duron e Kelly (1963), onde a adição de 0,2 mL de 5,5-ditiobis-2,2 ácido nitrobenzóico (DTNB) (2,5 mM) nas cubetas contendo 1,9 mL de tampão fosfato de potássio pH 8,0 e 0,1 mL do extrato ácido permitiu, após cerca de 2 min, a obtenção máxima de formação do ânion tiolato (TNB) de cor amarela, mensurável em 412 nm. As análises foram realizadas em duplicatas e os valores expressos em $\mu\text{mol.g}^{-1}$.

Foi calculada a concentração da GSH ($\mu\text{mol.g}^{-1}$) utilizando-se o coeficiente de extinção molar do ânion tiolato de $14,1 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$, segundo a equação (6):

$$[\text{GSH}] = \frac{\text{Amostra}_{412} \times 4}{14,1} \quad (6)$$

c) Atividade da enzima catalase (CAT)

Para análise da atividade desta enzima, quantificou-se a velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), em 240 nm, pela enzima presente na amostra (AEBI, 1984). Para tanto, amostras de tecidos do *pool* de 6 peixes foram

preparadas na diluição 1:20 (p/v) com tampão Tris (20 mM, pH 7,4), 0,1 % Triton e NaCl (150mM) e homogeneizadas com cerca de 20 impactos em homogeneizador Potter-Elvehjem. Após centrifugação (5000 g, 5 min), transferiu-se para uma cubeta de quartzo, 2 mL da solução de H₂O₂ e 20 µl de amostra de sobrenadante do homogenato. Após homogeneização, a velocidade de decomposição do H₂O₂ foi determinada, durante 60 segundos. A solução de peróxido de hidrogênio (10 mM), em tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 7,0) foi preparada e titulada no dia da análise. Todas as amostras foram analisadas em duplicatas, sendo os valores expressos em mmol de H₂O₂ consumido min⁻¹.g⁻¹, usando coeficiente de extinção molar de 40 M⁻¹.cm⁻¹.

Foi calculada a atividade da enzima CAT através da equação (7):

$$[CAT] = \frac{Amostra_{240} (Abs_{maior} - Abs_{menor}) \times 19 \times 60}{40} \quad (7)$$

3.7.1.4 Biomonitoramento dos efluentes utilizando ensaios de genotoxicidade com *Danio rerio*

A genotoxicidade foi verificada através de biomarcadores citogenéticos (RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES, 2003). Este ensaio foi realizado segundo norma da ABNT 15088 (2004) e da norma ISO 7346 (1996), com modificações. Os animais, após a aclimatação, foram divididos aleatoriamente em diferentes grupos de exposição. Em seguida, 6 animais foram transferidos para cada béquer de vidro de 600 mL, contendo 200 mL de efluentes. O primeiro grupo foi exposto a 20 % do efluente EB, o segundo grupo foi exposto a 20 % do efluente ETE, o terceiro grupo

foi exposto a 20 % do efluente QTS3 e o último grupo foi mantido apenas em água de torneira aerada sem cloro (controle negativo). Os animais foram expostos aos efluentes durante 2 dias, em ensaio agudo semi-estático.

a) Avaliação do dano ao DNA (Teste cometa)

A fragmentação do DNA foi avaliada através de eletroforese horizontal utilizando o teste cometa (SINGH et al., 1988) e os procedimentos de fixação e coração das amostras com nitrato de prata foram realizados segundo método proposto por Nadin, Vargas-Roig e Ciocca (2001), com mínimas modificações.

Amostras de cada peixe foram cortadas em pequenos pedaços (100 mg) e, em seguida, foi feito um homogenato individual em homogenizador de vidro, onde foram acrescentados 95 µL de solução de extração de núcleo que continha 1 mL de tampão fosfato pH 7,4; 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO); e 20 mM de EDTA. As células isoladas do homogenato (10 µl) foram então embebidas em 120 µl de agarose de baixo ponto de fusão (LMPA, 0,75 %), mantida a 37 °C. Esta mistura (células/LPMA) foi adicionada a uma lâmina de microscópio pré-coberta com uma camada de agarose de ponto de fusão normal (NMPA, 1 %). Então as lâminas foram mergulhadas por 1 h em solução de lise gelada que continha 2,5 mM NaCl, 100 mM EDTA, 1 % Triton X-100, 10 % DMSO, 1 % n-lauril sarcocinato e 10 mM Tris (pH 10). Após este período as lâminas foram mantidas por 20 min em tampão alcalino gelado (300 mM NaOH e 1 mM EDTA, pH 13). As lâminas contendo o DNA liberado foram submetidas a uma eletroforese horizontal por 15 min sob tensão elétrica de 25V e

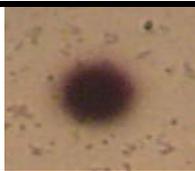
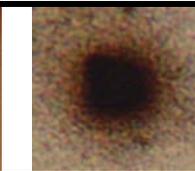
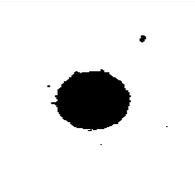
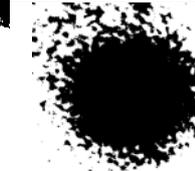
uma corrente elétrica de 300 mA. Posteriormente, as lâminas foram neutralizadas por 10 min em tampão Tris 0,4 M (pH 7,5) e, em seguida, foram expostas à solução de parada (15 g de ácido tricloroacético, 5 g de sulfato de zinco, 5 mL de glicerol e completou-se o volume com água destilada até 100 mL) por 5 min. As lâminas foram transferidas para solução de fixação (15 g de TCA, 5 g de sulfato de zinco, 5 mL de glicerol e completou-se o volume com água destilada até 100 mL), foram secas em estufa por 1 h e depois foram coradas com nitrato de prata, segundo Nadin, Vargas-Roig e Ciocca (2001), com mínimas modificações.

A solução corante foi preparada na seguinte seqüência: 34 mL de solução B (nitrato de amônio a 0,2 % p/v, nitrato de prata a 0,2 % p/v, ácido tungstosilícico a 0,5 % p/v, formaldeído a 0,15 % e carbonato de sódio a 5 % p/v) e 66 mL de solução A (carbonato de sódio a 5 % p/v). Misturou-se a solução A e B, e imediatamente as lâminas foram mantidas em contato com esta solução corante por 15 min em um banho-maria a 37 °C, ao abrigo da luz. Em seguida, as lâminas foram submersas individualmente na solução de parada (1 mL de ácido acético e completou-se o volume com água destilada até 100 mL) por 5 min, foram lavadas com água destilada e posteriormente foram secas ao ar.

Como controle interno da técnica, 100 µL de H₂O₂ (100 µM) foram misturados às amostras de homogenato dos animais do grupo controle e incubados durante 15 min a 25 °C. Para cada animal foram analisadas aleatoriamente imagens de 100 núcleos (50 núcleos por lâmina, em duplicatas) e o tamanho dos cometas (região do nucleóide + cauda) (Figura 13), foi classificado visualmente dentro de 5 classes de dano, variando de 0 (cometas sem dano) a 4 (cometas com dano máximo), de acordo com metodologia proposta por Collins; Ai-Guo e Duthie (1995),

com modificações. A fim de expressar o dano visualizado nas lâminas em valores numéricos, as lâminas foram fotografadas e as imagens obtidas foram tratadas com aplicativo Microsoft Paint™, disponível no software Windows Millennium Edition, 2000. Para a determinação das classes foram utilizadas as imagens tratadas com o aplicativo Microsoft Paint™, sendo que cada classe recebeu uma pontuação, de acordo com as características próprias de cada classe de dano, conforme demonstrado na tabela 5.

Tabela 5 – Pontuação e exemplos de cada classe de cometa visualizada através de coloração com nitrato de prata. Imagens de nucleóides presentes em homogenato de *Danio rerio* (n=6), expostos à água de torneira aerada (CN), a 20 % do efluente têxtil não remediado (EB20), 20 % de efluente remediado pela empresa (ETE20), e a 20 % do efluente remediado com quitosana pulverizada (QTS320), durante 2 dias. Imagens obtidas com câmera digital (aumento de 9,6 X) acoplada ao microscópio óptico (aumento de 1000 X) e tratadas com aplicativo Microsoft Paint™. Determinações realizadas em duplicatas.

	Classe 0	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Classe 4
Pontuação	0	1	2	3	4
Imagem digital do cometa					
Tratamento da Imagem Microsoft Paint™					

Para cada animal foi calculada uma pontuação de acordo com o número de cometas visualizados em cada classe, segundo a equação (8):

$$\text{Índice de dano ao DNA (ID)} = [(\text{N}^{\circ} \text{ de cometas classe } 0 \times 0) + (\text{N}^{\circ} \text{ de cometas classe } 1 \times 1) + (\text{N}^{\circ} \text{ de cometas classe } 2 \times 2) + (\text{N}^{\circ} \text{ de cometas classe } 3 \times 3) + (\text{N}^{\circ} \text{ de cometas classe } 4 \times 4)] \quad (8)$$

Conseqüentemente, obteve-se uma única pontuação para cada grupo estudado. Então, o índice de dano de cada grupo podia variar de 0 (ausência de dano) a 400 (presença de dano máximo). A visualização dos resultados foi realizada em um microscópio óptico inicialmente em aumento 10 X, em casos de dúvida entre as classes efetuou-se leitura da lâmina com objetiva de 1000 X para possibilitar a comparação com as imagens digitais utilizadas como gabarito, conforme tabela 5. Desta forma, a “cabeça” e a “cauda” dos cometas (Figura 13) foram mensuradas visualmente com base em fotomicrografias obtidas com câmera digital acoplada ao microscópio, utilizando objetiva com aumento de 1000 X e aumento de 9,6 X da câmera.

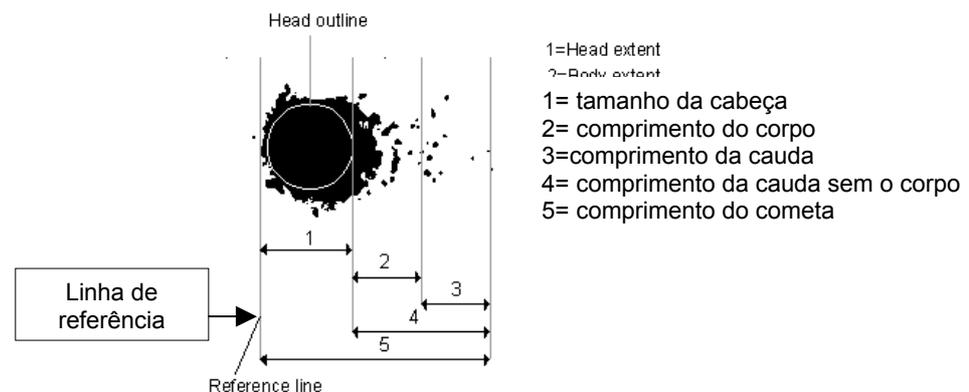


Figura 13 – Áreas do cometa que foram mensuradas para determinar a classe do cometa e para o cálculo do índice de dano (modificada de SINGH, 2005).

b) Avaliação do dano secundário ao DNA (Teste de micronúcleos)

O teste de micronúcleos é o ensaio *in vivo* mais amplamente empregado na detecção de agentes clastogênicos que causam quebras em cromossomos, e de

agentes aneugênicos que induzem segregação cromossômica anormal (MACGREGOR et al., 1987; HAYASHI et al., 1994). Os micronúcleos podem ser visualizados próximos ao núcleo principal (HAYASHI et al., 1998).

Após o sacrifício de cada animal, removeu-se a cabeça expondo a região cardíaca. Esta região foi pressionada contra uma lâmina de microscopia de modo a obter um esfregaço. Foram preparadas 2 lâminas para cada animal. Após secar por cerca de uma hora, os esfregaços foram fixados com metanol absoluto (99,5 %) durante 5 min, e secos ao ar em temperatura ambiente segundo método proposto por Hayashi, Sofuni e Ishidate Jr. (1983), com modificações.

Os esfregaços foram corados através do método Feuglen-Fast-Green. Para a hidrólise ácida, as lâminas foram colocadas em cubas de vidro contendo HCl 1 M à temperatura ambiente por 1 min. Em seguida, foram transferidas para cuba contendo HCl 1 M previamente aquecido a 63 °C e o conjunto foi mantido em banho-maria por 10 min. Em seguida, as lâminas foram retiradas da cuba e mantidas inclinadas por 15 min sobre papel. Ao término deste tempo, as lâminas foram transferidas para uma cuba contendo HCl 1 M à temperatura ambiente, permanecendo por mais 5 min. Posteriormente, as lâminas foram lavadas com água destilada, em intervalos de 5 min, totalizando um tempo de 15 min.

As lâminas, após secarem em temperatura ambiente por 2 dias, foram transferidas para cuba de vidro previamente coberta com papel alumínio e contendo reativo de Schiff, suficiente para as cobrir. O conjunto foi mantido em câmara escura à temperatura ambiente por 1 h. As lâminas foram lavadas com água destilada, repetiu-se este procedimento três vezes, por um tempo de 5 min para cada lavagem. Verificou-se então, ao microscópio, se a coloração dos núcleos estava adequada.

Para a coloração do citoplasma utilizou-se solução Fast Green a 0,5 %, onde as lâminas foram mantidas por 7 segundos e, após ter-se escorrido o excesso de corante, as mesmas foram mergulhadas individualmente por 3 vezes em etanol absoluto durante 2 min cada. Posteriormente, as lâminas foram secas à temperatura ambiente.

Para a determinação da frequência de micronúcleos foram contadas 2.000 células por lâmina, os valores obtidos foram expressos em frequência absoluta e frequência relativa em ‰ (DIEKMANN et al., 2004). Na figura 14 pode ser observada uma célula contendo micronúcleos próximos ao núcleo principal.

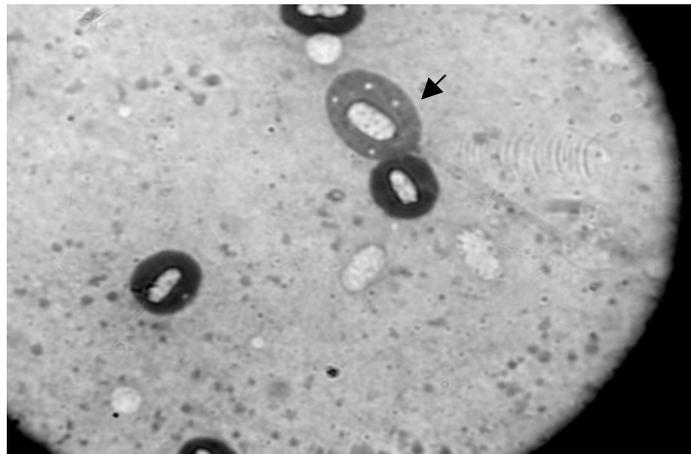


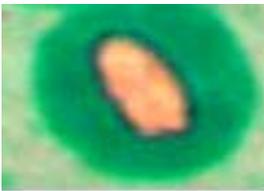
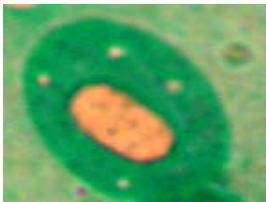
Figura 14 – Fotomicrografia de eritrócitos de *Danio rerio* corados pelo método Feulgen-Fast-Green, a seta indica célula com micronúcleos (câmera digital com aumento de 9,6 X acoplada ao microscópio óptico com aumento de 1000 X).

A fim de expressar numericamente os micronúcleos visualizados nas lâminas estas foram fotografadas com câmera digital (aumento de 9,6 X) acoplada ao microscópio óptico (aumento de 1000 X) (Figura 14) e as imagens obtidas foram tratadas com aplicativo Microsoft Paint™. Desta forma, foi possível confirmar a ocorrência dos micronúcleos com as imagens tratadas com o aplicativo Microsoft

Paint™, conforme demonstrado na tabela 6. Este aplicativo permitiu visualizar com maior nitidez os micronúcleos possibilitando o cálculo da frequência relativa de micronúcleos por grupo de exposição, conforme equação (9):

$$\text{Frequência de micronúcleos} = \frac{\text{Nº de micronúcleos} \times 1000}{4000} (\%) \quad (9)$$

Tabela 6 – Imagens de micronúcleos em eritrócitos de sangue periférico de *Danio rerio* (n= 6), expostos à água de torneira aerada (CN), a 20 % do efluente têxtil não remediado (EB20), a 20 % de efluente remediado pela empresa (ETE20), e a 20 % do efluente remediado com quitosana pulverizada (QTS320), durante 2 dias. Imagens obtidas com câmera digital (aumento de 9,6 X) acoplada ao microscópio óptico (1000 X) e tratadas com aplicativo Microsoft Paint™. Determinações realizadas em duplicatas.

Amostras	Número de micronúcleos por célula		
	Eritrócito sem micronúcleos	Eritrócitos com 1 micronúcleo	Eritrócito com 4 micronúcleos
Imagem digital das células			
Tratamento da Imagem com Microsoft Paint™			

3.8 Análise estatística

As análises estatísticas dos dados obtidos foram realizadas através de análise de variância (ANOVA), complementada pelo teste de Tukey-Kramer. Para tal utilizou-se o software INSTAT (GraphPad, San Diego, CA, USA), admitindo níveis de significância mínimos de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização da quitosana, das microesferas de quitosana e da quitosana pulverizada

4.1.1 Caracterização da quitosana pela determinação do grau de desacetilação e do diâmetro das microesferas

O grau médio de desacetilação (90 % \overline{GD}) da quitosana que representa a porcentagem de grupos amino distribuídos na cadeia polimérica foi determinado por titulação condutimétrica.

A quitosana pulverizada foi fotografada para se verificar suas características superficiais na ausência de reticulação, conforme pode ser visto nas figuras 15 e 16. Ampliações maiores não foram possíveis, pois a amostra de quitosana foi destruída com a passagem dos feixes de elétrons do microscópio eletrônico de varredura (MEV).

O diâmetro médio das microesferas foi de $1,03 \pm 0,06$ mm, determinado a partir da micrografia de vinte microesferas. Considerando-se os detalhes da superfície externa da microesfera de quitosana, foi observado que a mesma se apresentou pouco porosa.

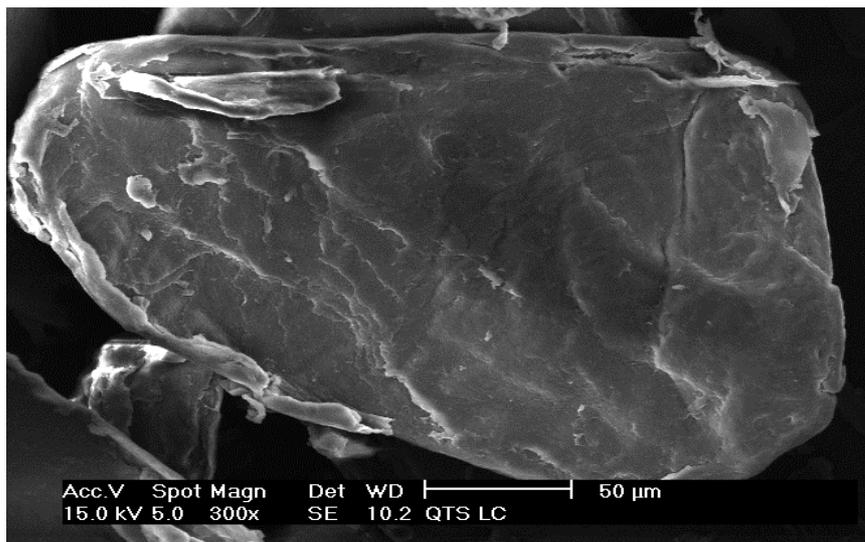


Figura 15 – Fotomicrografia obtida de partículas de quitosana pulverizada em microscópio eletrônico de varredura (ampliação 300 X).

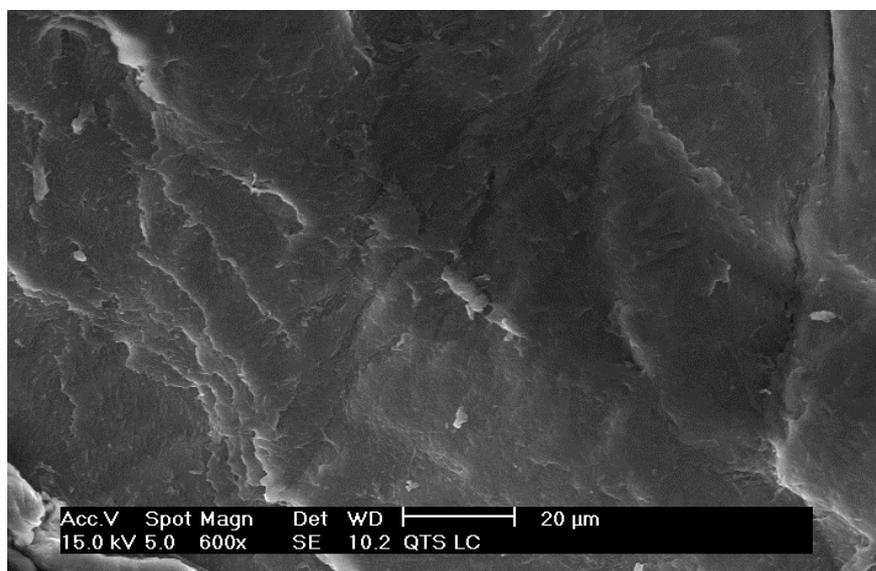


Figura 16 – Fotomicrografia obtida de partículas de quitosana pulverizada, para observação de sua morfologia superficial em microscópio eletrônico de varredura (ampliação 600 X).

4.2 Remediação dos efluentes

4.2.1 Etapa 1 – Seleção de formulação de quitosana para remediação de efluente têxtil

4.2.1.1 Determinação da porcentagem de remoção de cor dos efluentes

Na tabela 7 são apresentados os resultados referentes à porcentagem de remoção de cor do efluente EB, ETE, QTS1, QTS2 e QTS3.

Com relação à remoção de cor, o tratamento convencional da indústria com lodos ativados e uso de sulfato de alumínio, descolorante e polieletrólito, foi mais eficaz (96,15 % de remoção de cor) que todos os tratamentos realizados com a quitosana. Entretanto, é importante ressaltar que a QTS3 também causou significativa remoção de cor do efluente (80,76 %).

Na tabela 8 são apresentados os valores de absorbância e porcentagem de remoção de cor, obtidos a partir dos efluentes EB e QTS_A até QTS_F para a seleção da melhor concentração da formulação a ser utilizada na remediação dos efluentes. Foram testadas as formulações de quitosana de 0,1 a 1,0 g para a remediação de um volume de 20 mL de efluente têxtil bruto.

A formulação QTS_C (0,3 g) foi escolhida para realizar o tratamento dos efluentes em função de tratar-se da dosagem mais baixa que apresentou diferença significativa em relação ao efluente EB. Ela foi escolhida também por não ter

apresentado diferença estatística em relação ao ETE. A formulação QTS_C foi então denominada como QTS3.

Tabela 7 – Leitura de absorvâncias (a 517 nm) e porcentagem de remoção de cor, referentes ao efluente têxtil não remediado (EB); remediado pela empresa (ETE); remediado com microesferas de quitosana (QTS1), com quitosana solubilizada em ácido acético (QTS2) e com quitosana pulverizada (QTS3). Todos os valores foram expressos como média \pm EPM. (***) diferença estatística significativa ($p < 0,001$) em relação ao EB. Determinações realizadas em triplicatas.

Amostras	Absorvância (517 nm)	Remoção de cor (%)
EB	0,524 \pm 0,006	0
ETE	0,020 \pm 0,001***	96,15 \pm 5,00***
QTS 1	0,130 \pm 0,004***	75,00 \pm 3,10***
QTS 2	0,140 \pm 0,004***	73,10 \pm 2,80***
QTS3	0,102 \pm 0,001***	80,76 \pm 1,00***

Tabela 8 – Leitura de absorvâncias (a 517 nm) e porcentagem de remoção de cor. Resultados referentes ao efluente têxtil não remediado (EB) e remediado com diferentes formulações de quitosana empregadas: QTS_A (0,1 g); QTS_B (0,2 g); QTS_C (0,3 g); QTS_D (0,4 g); QTS_E (0,5 g) e QTS_F (1,0 g). Todos os valores foram expressos como média \pm EPM. (***) representa diferença estatística significativa ($p < 0,001$) em relação ao EB. Determinações realizadas em triplicatas.

Efluentes	Absorvância (517 nm)	Remoção de cor (%)
EB	0,524 \pm 0,006	0
QTS _A	0,170 \pm 0,018***	67,30 \pm 10,60***
QTS _B	0,134 \pm 0,004***	75,00 \pm 3,00***
QTS _C	0,102 \pm 0,001***	80,76 \pm 1,00***
QTS _D	0,135 \pm 0,004***	75,00 \pm 3,07***
QTS _E	0,118 \pm 0,004***	76,92 \pm 3,33***
QTS _F	0,139 \pm 0,011***	73,07 \pm 7,85***

4.2.2 Análises físico-químicas dos efluentes não remediados e remediados

4.2.2.1 Verificação do pH

Na tabela 9 são apresentados os valores de pH obtidos nas análises químicas realizadas com efluentes EB; ETE, QTS1, QTS2 e QTS3. Com relação ao pH, pode-se observar que os tratamentos com QTS3 e ETE causaram ligeira elevação do pH ao passo que QTS1 causou forte redução deste parâmetro.

Tabela 9 – Valores de pH referentes ao efluente têxtil não remediado (EB); remediado pela empresa (ETE); remediado com microesferas de quitosana (QTS1), com quitosana solubilizada em ácido acético (QTS2) e com quitosana pulverizada (QTS3). Determinações realizadas em triplicatas.

Efluentes	pH
EB	7,5 ± 0,3
ETE	7,6 ± 0,2
QTS1	3,5 ± 0,1
QTS2	7,0 ± 0,3
QTS3	7,7 ± 0,2

4.2.2.2 Análise de metais

Na tabela 10 são apresentados os resultados obtidos referentes às análises químicas realizadas no efluente têxtil EB, ETE e no QTS3. Com relação à concentração de metais, os dados obtidos demonstram que ambas as remediações realizadas promoveram a remoção dos metais. Entretanto, QTS3 promoveu a redução de todos os metais enquanto ETE houve o aumento na concentração de

alguns deles (Co, Mg, Pb, Rb e Th). Por motivo de ordem técnica, não foram realizadas as análises de metais para os efluentes QTS1 e QTS2.

Tabela 10 – Concentração de metais no efluente têxtil não remediado (EB), remediado pela empresa (ETE) e remediado com quitosana pulverizada (QTS3). Determinações realizadas em duplicatas.

Metal	EB	ETE	QTS3
Concentração (X 10⁻³) ppm			
Al	0,382	0,356	0,109
Cd	0,000	0,000	0,000
Co	0,227	0,229	0,072
Cr	0,039	0,036	0,013
Cu	0,000	0,000	0,000
Fe	0,837	0,628	0,033
Hg	0,000	0,000	0,000
Li	22,215	20,695	10,138
Mg	1364,000	2420,000	415,000
Mn	0,068	0,028	0,015
Mo	0,369	0,303	0,114
Pb	0,859	1,197	0,110
Rb	8,743	9,276	2,623
Th	2,160	3,410	0,103
Zn	0,000	0,000	0,000

4.2.2.3 Determinação da condutividade e dureza

Na tabela 11 são apresentados os resultados obtidos referentes às análises químicas para determinação da condutividade e dureza de amostras de: água de torneira aerada e sem cloro, e efluentes EB, ETE e QTS3.

Os resultados obtidos mostram que a remediação com QTS3 causou redução na condutividade (2,1 vezes) e na dureza (4,6 vezes) comparativamente ao

efluente EB. Com relação ao controle negativo (água de torneira) o QTS3 não apresentou diferença estatística significativa. Por motivo de ordem técnica não foram realizadas as determinações de condutividade e de dureza para os efluentes QTS1 e QTS2.

É importante notar que o efluente QTS3 causou uma redução da condutividade no efluente muito maior do que aquela observada no tratamento convencional realizado pela empresa em estudo.

Tabela 11 – Características físico-químicas (condutividade e dureza) do efluente têxtil não remediado (EB), remediado pela empresa (ETE) e remediado com quitosana pulverizada (QTS3). Todos os valores foram expressos como média \pm EPM. (***) e (*) representam diferenças estatísticas significativas em relação ao EB para $p < 0,001$ e $p < 0,05$; respectivamente. Determinações realizadas em triplicatas.

Efluentes	Condutividade $\mu\text{S.cm}^{-1}$ 25 °C	Dureza em CaCO_3 mg.L ⁻¹
Água de torneira	61,65 \pm 2,31***	120,00 \pm 7,70***
EB	4693,00 \pm 54,01	890,00 \pm 44,00
ETE	4550,00 \pm 54,00*	111,00 \pm 22,00***
QTS3	2253,00 \pm 3,33***	196,00 \pm 39,00***

4.2.2.4 Avaliação da toxicidade aguda dos efluentes utilizando *Artemia* sp e *Daphnia magna*

Os resultados referentes aos testes de toxicidade aguda usando os microcrustáceos *Artemia* sp expostos aos efluentes EB, ETE, QTS1, QTS2 e QTS3 são apresentados na tabela 12. Os dados obtidos mostraram que após 24 h de remediação o efluente QTS2 apresentou maior toxicidade para os microcrustáceos com concentração efetiva ($CE_{50} = 15,05\%$), superando inclusive o apresentado pelo

efluente EB ($CE_{50}=12,22\%$), enquanto que o efluente QTS3 causou uma redução total da toxicidade, impossibilitando estabelecer a CE_{50} uma vez que em nenhuma das concentrações da formulação QTS3 testadas ocorreu imobilidade dos animais. Por outro lado, QTS1 e ETE também não apresentaram toxicidade.

Os resultados obtidos com *D. magna* também confirmam que novamente a remediação com QTS3 diminuiu substancialmente a toxicidade do efluente, de tal forma que impossibilitou estabelecer a CE_{50} do mesmo, pois em nenhuma das concentrações testadas ocorreu toxicidade. Diferentemente, o efluente ETE apresentou toxicidade elevada com $FD=4$, assim como o valor apresentado pelo efluente EB, que foi determinado como sendo $FD=2$. Curiosamente, em QTS1 e QTS2 houve uma forte elevação da toxicidade do efluente ($FD=8$).

Tabela 12 – Toxicidade aguda para bioindicadores (*Artemia* sp, n=10 e *Daphnia magna*, n=10) utilizados na seleção da quitosana. Resultados referentes ao efluente têxtil não remediado (EB); remediado pela empresa (ETE); remediado com microesferas de quitosana (QTS1), quitosana solubilizada em ácido acético (QTS2) e quitosana pulverizada (QTS3). Determinações realizadas em triplicatas.

Efluentes	Tratamento	Concentração Efetiva (CE_{50}) (%)	
		<i>Artemia</i> sp	<i>Daphnia magna</i>
EB	Sem tratamento	12,22	2
ETE	Lodos Aeróbios Sulfato de Alumínio + Descolorante + Polieletrólito	n.a.t.	4
QTS1	Microesferas	n.a.t.	8
QTS2	QTS pulverizada (Ácido Acético a 1 % + Óxido de Cálcio a 1 %)	15,05	8
QTS3	QTS pulverizada	n.a.t.	1

n.a.t. = não apresentou toxicidade

4.2.3. Etapa 2 – Remediação e biomonitoramento do efluente têxtil com a quitosana selecionada (QTS3)

4.2.3.1 Biomonitoramento dos efluentes utilizando ensaios de toxicidade aguda

4.2.3.1.1 Ensaio de toxicidade aguda com *Vibrio fischeri*

Na tabela 13 são apresentados os resultados referentes ao ensaio estático de toxicidade aguda utilizando bactérias bioluminescentes (*Vibrio fischeri*) expostas a diferentes diluições (50; 25; 12,5; 6,25; 3,1; 1,5; 0,7; 0,3; 0,1 %) dos efluentes EB, ETE, e QTS3. Os resultados mostram que a remediação do efluente com QTS3 promoveu a redução da toxicidade (FD=1), enquanto que o EB apresentou FD=64, causando elevada toxicidade às bactérias, que reagiram reduzindo a bioluminescência. O ETE também causou redução na toxicidade (FD=1).

Tabela 13 – Ensaio de toxicidade aguda com *Vibrio fischeri* ($n = 10^6$ UFC), expostas às diferentes diluições do efluente têxtil não remediado (EB), remediado pela empresa (ETE) e remediado com quitosana pulverizada (QTS3). Determinações realizadas em duplicatas.

Efluentes	CE ₅₀ (%)	Fator de Diluição (FD)
Água de torneira aerada	n.a.	n.a.
EB	10,64	64
ETE	n.a.t.	1
QTS3	n.a.t.	1

n.a. = não aplicável; n.a.t. = não apresentou toxicidade

4.2.3.1.2 Ensaio de toxicidade aguda com *Artemia* sp

Na tabela 14 são apresentados os resultados obtidos após a exposição de náuplios de *Artemia* sp às diferentes diluições (100; 75; 50; 25; 12,5; 6,2; 3,1; 1,5 %) de EB, ETE e QTS3. Os resultados mostram que a remediação com quitosana, assim como a remediação efetuada pela empresa, reduziram totalmente a toxicidade para os microcrustáceos, pois nenhum indivíduo imóvel foi encontrado em nenhuma das diluições testadas, o que inviabilizou o cálculo da CE_{50} .

Paralelamente, foram conduzidos ensaios com dicromato de potássio como controle positivo na concentração $1,75 \text{ mg.L}^{-1}$, sendo que após 24 h de exposição todos os microcrustáceos morreram. Como controle negativo utilizou-se apenas água de cultivo (sal marinho sintético a 30 g.L^{-1}), na qual nenhum microcrustáceo permaneceu imóvel durante a realização do experimento.

Tabela 14 – Ensaio de toxicidade aguda com náuplios de *Artemia* sp (n=10), expostos às diluições de efluente têxtil não remediado (EB), remediado pela empresa (ETE) e remediado com quitosana pulverizada (QTS3). Determinações realizadas em triplicatas.

Efluentes	CE_{50} (%)
Água de torneira aerada	n.a.
EB	12,22
ETE	n.a.t.
QTS3	n.a.t.

n.a. = não aplicável; n.a.t.= não apresentou toxicidade

4.2.3.1.3 Ensaio de toxicidade aguda com *Daphnia magna*

Na tabela 15 são apresentados os resultados obtidos a partir da exposição de formas juvenis de *Daphnia magna* às diferentes diluições de EB, ETE e QTS3. Os resultados mostram mais uma vez que a remediação com quitosana eliminou totalmente a toxicidade para os microcrustáceos, pois nenhum indivíduo imóvel foi encontrado em nenhuma das diluições testadas, o que inviabilizou o cálculo da CE₅₀.

Por outro lado, a remediação efetuada pela empresa (ETE) não foi capaz de reduzir completamente a toxicidade do efluente para os microcrustáceos, pois a concentração efetiva (CE₅₀=49,80 %) manteve-se alta e muito próxima do valor que foi determinado para o efluente EB (CE₅₀=49,98 %).

Tabela 15 – Ensaio de toxicidade aguda empregando juvenis de *Daphnia magna* (n=10), expostos às diluições do efluente têxtil não remediado (EB), remediado pela empresa (ETE) e remediado com quitosana pulverizada (QTS3). Determinações realizadas em triplicatas.

Efluentes	CE ₅₀ (%)	Fator de Diluição (FD)
Água de torneira aerada	n.a.	n.a.
EB	49,98	2
ETE	49,80	4
QTS3	n.a.t.	1

n.a. = não aplicável; n.a.t. = não apresentou toxicidade

4.2.3.1.4 Ensaio de toxicidade subcrônica com *Allium cepa*

a) Teste de inibição de germinação de sementes e de crescimento de plântulas de *Allium cepa*

Na tabela 16 são apresentados os resultados obtidos a partir da exposição de sementes e de plântulas de *Allium cepa* à água mineral, ao EB, ETE e QTS3. Os resultados mostram que a remediação com quitosana, assim como a remediação efetuada pela empresa, causaram inibição da germinação de sementes similares aos valores do controle negativo, não havendo diferença estatística entre os valores obtidos.

Paralelamente, foram conduzidos ensaios com dicromato de potássio ($1,75 \text{ mg.L}^{-1}$) como controle positivo. Esta concentração causou forte inibição na germinação das sementes ($76,00 \pm 3,21 \%$) e no crescimento das plântulas ($97,55 \pm 5,00 \%$) e, em ambos os casos, houve diferença estatisticamente significativa entre todos os efluentes e o controle positivo ($p < 0,001$).

Com relação à inibição do crescimento das plântulas, verificou-se que ocorreram diferenças significativas entre os efluentes EB, ETE e QTS3 em relação ao controle negativo ($p < 0,001$). Por outro lado, os efluentes ETE e QTS3 não apresentaram diferença significativa em relação ao EB.

Tabela 16 – Ensaio de toxicidade subcrônica empregando sementes e plântulas de *Allium cepa* (n=100), expostas ao efluente têxtil não remediado (EB), ao remediado pela empresa (ETE) e ao remediado com quitosana pulverizada (QTS3). Todos os valores foram expressos como média \pm EPM. (***) representa diferença estatística significativa em relação ao efluente EB ($p < 0,001$). Determinações realizadas em triplicatas.

Efluentes	Inibição da germinação de sementes (%)	Inibição do crescimento de plântula (%)
Água Mineral	21,40 \pm 2,96	0***
K ₂ Cr ₂ O ₇	76,00 \pm 3,21***	97,55 \pm 5,00***
EB	26,67 \pm 6,22	16,26 \pm 1,60
ETE	25,00 \pm 1,52	16,75 \pm 1,47
QTS3	26,00 \pm 5,29	23,34 \pm 1,60

b) Ensaio de inibição do crescimento de raiz de bulbos de *Allium cepa*

Na tabela 17 são apresentados os resultados obtidos a partir da exposição da base dos bulbos à água mineral (controle negativo), ao efluente EB, ETE e QTS3. Os resultados mostram que a remediação com quitosana reduziu consideravelmente a toxicidade, o que determinou a menor taxa de inibição do crescimento de raiz (39,6 \pm 6,6 %), comparativamente aos demais efluentes. Por outro lado, o tratamento com ETE causou forte inibição no crescimento da raiz sendo esta maior do que aquela observada com EB.

Paralelamente, utilizou-se dicromato de potássio (1,75 mg.L⁻¹) como controle positivo. Esta concentração causou forte inibição no crescimento das raízes (97,6 \pm 33,3 %), apresentando diferença estatística em relação ao controle negativo ($p < 0,01$).

Tabela 17 – Inibição de crescimento de raízes de bulbos de *Allium cepa* (n=6), expostos à água mineral (controle negativo), ao dicromato de potássio ($1,75 \text{ mg.L}^{-1}$) (controle positivo), ao efluente têxtil não remediado (EB), ao remediado pela empresa (ETE) e ao remediado com quitosana pulverizada (QTS3), durante 3 dias. Todos os valores foram expressos como média \pm EPM. (**), (***) representam diferenças estatísticas significativas em relação ao efluente EB para ($p < 0,001$) e ($p < 0,01$), respectivamente. ($^{\alpha}$) representa diferença estatisticamente significativa de QTS3 em relação ao ETE ($p < 0,05$). Determinações realizadas em triplicatas.

Efluentes	Crescimento da raiz (cm)	Inibição de crescimento da raiz (%)
Água mineral	$2,50 \pm 0,30^{**}$	0
$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	$0,06 \pm 0,02^{***}$	$97,60 \pm 33,30$
EB	$1,30 \pm 0,15$	$48,00 \pm 11,50$
ETE	$0,55 \pm 0,14^{**}$	$78,00 \pm 25,50^*$
QTS3	$1,51 \pm 0,10$	$39,60 \pm 6,60$

4.2.3.1.5 Ensaio de toxicidade aguda com *Danio rerio* para determinação da dose de não efeito

Os resultados obtidos demonstraram que a menor diluição onde não houve nenhuma mortalidade de *Danio rerio* expostos aos diferentes efluentes foi 20 % (Tabela 18), sendo esta diluição selecionada para os ensaios de toxicidade subcrônica com *D. rerio*.

Tabela 18 – Ensaio de toxicidade aguda empregando *Danio rerio* (n=6), expostos à água de torneira aerada (CN) e às diluições de efluente têxtil não remediado (EB), remediado pela empresa (ETE) e remediado com quitosana pulverizada (QTS3), por 48 h. Determinações realizadas em triplicatas.

Efluentes	Porcentagem de mortalidade (%)
Água de torneira aerada	0
EB a 100 %	100
EB a 50 %	100
EB a 30 %	100
EB a 20 %	0
EB a 1 %	0
ETE a 100 %	0
ETE a 50 %	0
ETE a 30 %	0
ETE a 20 %	0
ETE a 1 %	0
QTS a 100 %	0
QTS a 50 %	0
QTS a 30 %	0
QTS a 20 %	0
QTS a 1 %	0

4.2.3.1.6 Ensaio de toxicidade subcrônica com *Danio rerio*

a) Avaliação do dano às membranas celulares através da medida da lipoperoxidação (TBARS)

Na figura 17 são apresentados os resultados obtidos a partir da exposição de *Danio rerio*, durante 7 dias, a 20 % dos efluentes EB, ETE e QTS3. Os peixes expostos ao efluente QTS320 apresentaram os menores níveis de lipoperoxidação ($55,06 \pm 11,42 \text{ nmol.g}^{-1}$) comparativamente ao ETE20 ($78,60 \pm 4,45 \text{ nmol.g}^{-1}$), sem

no entanto apresentar diferença significativa em relação aos animais do controle negativo (CN) ($52,72 \pm 9,18 \text{ nmol.g}^{-1}$).

Por outro lado, os peixes que foram expostos ao efluente EB20 ($123,56 \pm 10,72 \text{ nmol.g}^{-1}$) apresentaram valores 2,3 vezes maiores do que os apresentados pelos peixes mantidos em água de torneira aerada (CN), cerca de 1,6 vezes maiores do que os apresentados pelos peixes mantidos em ETE20, e cerca de 2,2 vezes maiores do que o QTS320.

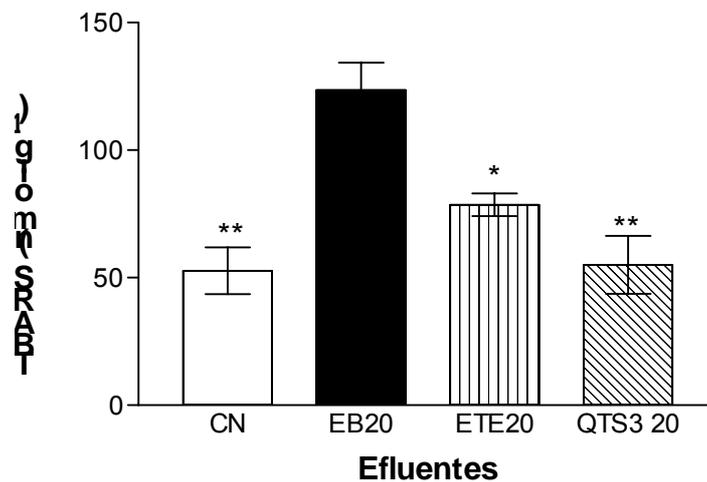


Figura 17 – Índice de lipoperoxidação (TBARS, nmol.g^{-1}) em homogenato de *pool* de *Danio rerio* ($n=6$), expostos à água de torneira aerada (CN), a 20 % do efluente têxtil não remediado (EB20), a 20 % do efluente remediado pela empresa (ETE20) e a 20 % do efluente remediado com quitosana pulverizada (QTS320), durante 7 dias. Todos os valores foram expressos como média \pm EPM. (**) e (*) representam diferenças estatísticas significativas em relação ao EB20, para ($p<0,01$) e ($p<0,05$), respectivamente. Determinações realizadas em triplicatas.

b) Glutathiona reduzida (GSH)

A figura 18 apresenta os resultados obtidos com relação à concentração de GSH de *D. rerio* expostos por 7 dias a 20 % dos efluentes EB, ETE e QTS3.

Os peixes expostos a QTS320 também apresentaram os menores níveis de GSH ($8,34 \pm 0,94 \mu\text{mol.g}^{-1}$) comparativamente ao EB20 ($31,43 \pm 6,01 \mu\text{mol.g}^{-1}$) com diferença significativa ($p < 0,001$). Não houve diferença estatística de QTS320 em relação ao controle negativo (CN) ($9,17 \pm 0,30 \mu\text{mol.g}^{-1}$).

Da mesma forma, os animais expostos ao efluente ETE20 ($13,70 \pm 1,46 \mu\text{mol.g}^{-1}$) apresentaram diferença estatística em relação aos animais expostos ao efluente EB20 ($p < 0,001$). Curiosamente houve um aumento de 3,4 vezes na concentração da GSH nos animais expostos ao efluente EB20, em relação ao grupo controle negativo (CN).

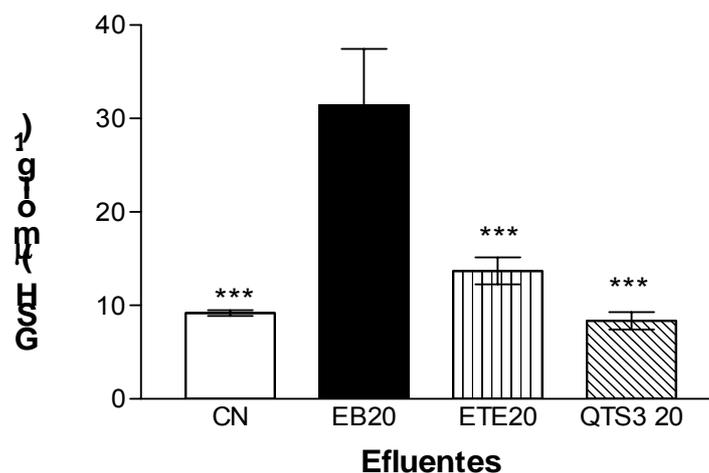


Figura 18 – Concentração de GSH ($\mu\text{mol.g}^{-1}$) em homogenato de *pool* de *Danio rerio* ($n=6$), expostos à água de torneira aerada (CN), a 20 % do efluente têxtil não remediado (EB20), a 20 % do efluente remediado pela empresa (ETE20) e a 20 % do efluente remediado com quitosana pulverizada (QTS320), durante 7 dias. Todos os valores foram expressos como média \pm EPM. (***) representa diferença estatística significativa ($p < 0,001$), em relação ao efluente EB20. Determinações realizadas em triplicatas.

c) Atividade da enzima catalase (CAT)

Na figura 19 constam os resultados obtidos com 7 dias de exposição, após os quais a atividade manteve-se elevada em *Danio rerio* expostos tanto no efluente QTS320 ($118,30 \pm 9,30 \text{ mmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$) quanto no efluente ETE20 ($102,70 \pm 4,52 \text{ mmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$). Ambos não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre si e em relação ao controle negativo (CN) ($103,65 \pm 10,76 \text{ mmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$).

Nos animais expostos ao efluente EB20 ($45,85 \pm 1,90 \text{ mmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$), houve uma redução na atividade desta enzima. Pode-se verificar também que os animais expostos aos efluentes QTS3 20 e ETE20 apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação aos animais expostos ao efluente EB20 ($p < 0,001$ e $p < 0,01$; respectivamente) sem, no entanto, apresentar diferença em relação ao grupo controle (CN).

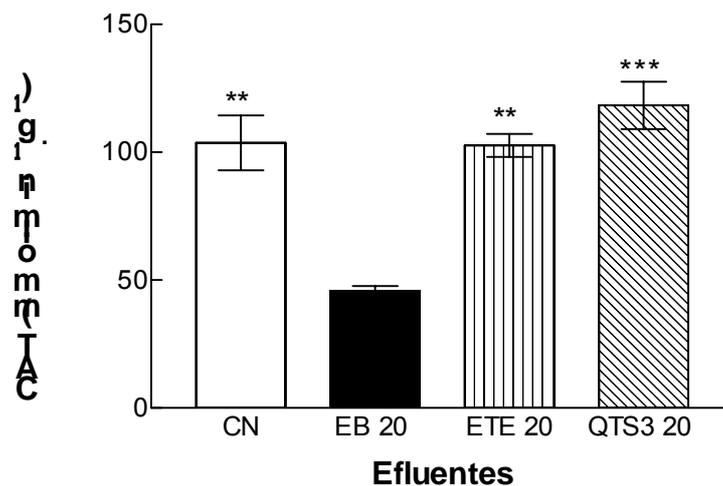


Figura 19 – Atividade enzimática da catalase (CAT) (expressa em mmol de H₂O₂ consumido min⁻¹.g⁻¹) em homogenato de pool de *Danio rerio* (n=6), expostos à água de torneira aerada (CN), a 20 % do efluente têxtil não remediado (EB20), a 20 % de efluente remediado pela empresa (ETE20) e a 20 % de efluente remediado com quitosana pulverizada (QTS320), durante 7 dias. Todos os valores foram expressos como média ± EPM. (***) e (**) representam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,001$) e ($p < 0,01$), respectivamente, em relação ao efluente EB20. Determinações realizadas em duplicatas.

4.2.3.1.7 Ensaios de genotoxicidade com *Danio rerio*

a) Avaliação do dano ao DNA (Teste cometa)

A tabela 19 apresenta a frequência de distribuição de cometas em cada classe por tipo de exposição realizada. Os resultados para os grupos expostos a 20 % do efluente QTS3 e o controle negativo mostraram uma predominância das classes associadas a um dano menor (classes 0 e 1). Por outro lado, nos grupos expostos a 20 % do efluente ETE houve um aumento nas frequências das classes de maior dano (classes 2, 3 e 4), em relação ao controle negativo (CN).

Tabela 19 – Frequência de classes de dano ao DNA (teste cometa) em homogenato de *Danio rerio* (n=6), expostos à água de torneira aerada (CN), a 20 % do efluente têxtil não remediado (EB20), a 20 % de efluente remediado pela empresa (ETE20) e a 20 % do efluente remediado com quitosana pulverizada (QTS320), durante 2 dias. Todos os valores foram expressos como média \pm EPM. Determinações realizadas em duplicatas.

Efluentes (20 %)	Frequência das Classes de Dano (%)				
	Classe 0	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Classe 4
Água torneira Aerada (CN)	79,3 \pm 14,2	17,0 \pm 11,0	0,6 \pm 1,2	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
EB20	12,5 \pm 7,0	7,5 \pm 10,5	23,7 \pm 1,7	6,2 \pm 5,2	0,0 \pm 0,0
ETE20	35,6 \pm 6,7	10,2 \pm 5,7	3,4 \pm 4,2	0,3 \pm 0,8	0,6 \pm 1,1
QTS320	40,0 \pm 7,0	8,7 \pm 4,5	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0

Os resultados referentes ao índice de dano ao DNA para o homogenato de cada um dos seis peixes expostos em diferentes tratamentos, são apresentados na figura 20. O índice de dano apresentado pelos peixes expostos ao efluente QTS320 (3,00 \pm 0,70) apresentou diferença estatística em relação ao apresentado pelo

efluente EB20 ($29,50 \pm 0,50$), para $p < 0,001$. Também não diferiu estatisticamente em relação ao grupo controle negativo ($4,75 \pm 1,50$).

O efluente QTS320 representou apenas 10,16 % do índice de dano verificado nos peixes expostos ao efluente EB20, enquanto o efluente remediado pela empresa ETE20 ($8,25 \pm 1,10$) representou 27,9 % comparativamente ao EB20, conforme pode ser visualizado na figura 20.

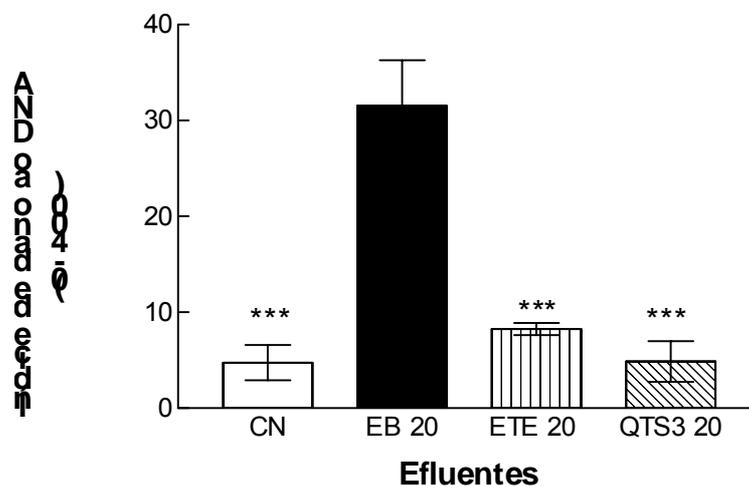


Figura 20 – Índice de dano ao DNA (teste cometa) em homogenato de *Danio rerio* (n=6), expostos à água de torneira aerada (CN), a 20 % do efluente têxtil não remediado (EB20), a 20 % de efluente remediado pela empresa (ETE20) e a 20 % do efluente remediado com quitosana pulverizada (QTS320), durante 2 dias. Todos os valores foram expressos como média \pm EPM. (***) representa diferença estatística significativa em relação ao EB20 ($p < 0,001$). Determinações realizadas em duplicatas.

b) Avaliação do dano secundário ao DNA (Teste de micronúcleos)

Os resultados referentes à frequência de micronúcleos em eritrócitos de peixes expostos aos diferentes tratamentos são apresentados na figura 21. Os

resultados obtidos com os ensaios no teste de micronúcleos confirmaram aqueles que foram obtidos com a fragmentação do DNA no teste cometa. Os peixes expostos ao efluente QTS320 durante 48 h, apresentaram menor frequência de micronúcleos ($0,37 \pm 0,12 \text{ ‰}$) estatisticamente significativa em relação ao EB20 ($1,15 \pm 0,16 \text{ ‰}$), para $p < 0,01$. Além de não terem diferido estatisticamente dos animais do grupo controle negativo (CN) ($0,37 \pm 0,12 \text{ ‰}$), nem do ETE20 ($0,57 \pm 0,08 \text{ ‰}$). O efluente ETE20, por outro lado, também diferiu estatisticamente do efluente EB20 ($p < 0,01$).

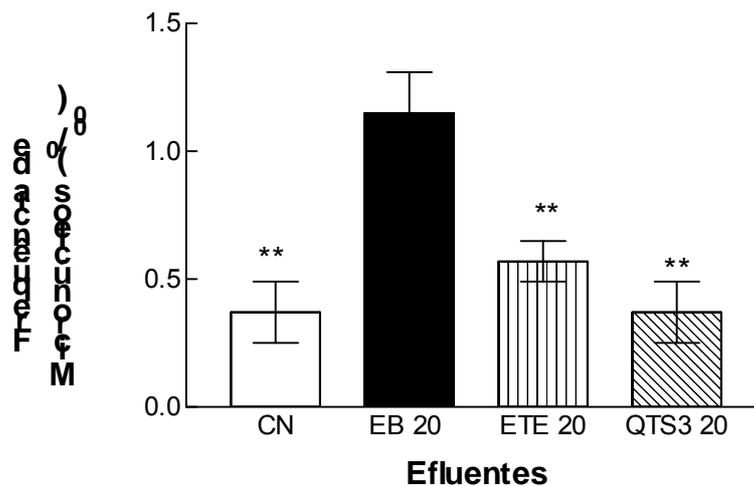


Figura 21 – Frequência de micronúcleos em eritrócitos de sangue periférico de *Danio rerio* (n=6), expostos à água de torneira aerada (CN), a 20 % do efluente têxtil não remediado (EB20), a 20 % de efluente remediado pela empresa (ETE20) e a 20 % do efluente remediado com quitosana pulverizada (QTS320), durante 2 dias. Todos os valores foram expressos como média \pm EPM. (**) representa diferença estatística significativa em relação ao EB20 para ($p < 0,01$). Determinações realizadas em duplicatas.

5 DISCUSSÃO

A quitosana pulverizada foi apontada por Kimura (2001) como sendo um agente adsorvente adequado à remoção de cor de corantes e de efluentes têxteis. Já Spinelli (2001) considerou este biopolímero como um coagulante adequado ao tratamento de águas superficiais destinadas ao abastecimento público. Chen, Chen e Wu (2003) também consideraram a quitosana como um floculante orgânico adequado ao tratamento de água e efluentes. O trabalho realizado por estes pesquisadores elucidou os mecanismos envolvidos na floculação com quitosana. Estes autores verificaram que a massa molar de quitosana exerce um papel na floculação maior do que o exercido pelo grau de desacetilação. Também foi postulado que, em termos de microambiente estrutural, as ligações em ponte são dominantes em relação à capacidade deste floculante em promover a neutralização de cargas.

Por outro lado, a capacidade de atuar com agente floculante também varia com o aumento do grau de desacetilação da quitosana. Quando ocorre um aumento no número de grupos amino ($-NH_2$) na cadeia do polímero ocorre um aumento da massa molar da quitosana. A elevação da massa molar, por sua vez, determina uma mudança na configuração da molécula de quitosana em solução, que pode adquirir a forma estendida ou enovelada (CHEN; CHEN; WU, 2003).

Com relação à morfologia das partículas de quitosana pulverizada utilizada na presente pesquisa verificou-se a predominância de flocos com certa uniformidade em suas dimensões, apresentando uma superfície irregular com estrias e dobras suaves que proporcionaram um aumento na área de contato entre a partícula e os

efluentes, favorecendo o processo de adsorção. Em estudos previamente realizados no Laboratório QUITTECH por Valentini et al. (2000) e por Kimura (2001), verificou-se que a quitosana em pó, flocos e microsferas, utilizadas na presente pesquisa, apresentaram pouca porosidade. É importante destacar que a porosidade é outro fator que pode influenciar diretamente a velocidade de adsorção (KIMURA, 2001).

O uso do polieletrólito quisotana pulverizada como coagulante no processo de tratamento de águas apresenta ainda a vantagem de ser atóxica (SPINELLI, 2001), enquanto o uso de sulfato de alumínio e outros compostos de alumínio como coagulante inorgânico no tratamento de águas de rios ou lagos, pode determinar um aumento significativo do conteúdo deste metal na água tratada e, desta forma, representar riscos à saúde (KEITH et al., 1999).

No presente trabalho, na busca pela formulação de quitosana mais adequada, foram realizadas três abordagens para a remediação do efluente têxtil. Inicialmente, com microsferas de quitosana as quais, apesar de possibilitarem a remoção de cor do efluente têxtil levaram a uma importante redução do pH (Tabela 9). Resultado semelhante foi obtido por Kimura et al. (2001), que verificaram uma maior remoção da cor de efluentes têxteis em pH ácido, com microsferas de quitosana.

Provavelmente devido à redução do pH, o efluente remediado com QTS1 demonstrou toxicidade frente aos organismos bioindicadores *Artemia* sp e *Daphnia magna* e, por esta razão, foi descartado dos ensaios posteriores.

No caso da remediação com QTS2, onde foi utilizado o processo de coagulação/floculação com quitosana, embora tenha havido uma importante

porcentagem de remoção de cor do efluente (Tabela 7) houve também elevada toxicidade para os organismos bioindicadores (Tabela 12). É importante observar que houve a necessidade de utilizar óxido de cálcio para correção do pH da solução de quitosana, antes de efetuar a remediação do efluente. Considerando-se que o óxido de cálcio causou toxicidade em ensaios preliminares realizados com *Artemia* sp, provavelmente por esta razão o efluente QTS2 também causou importante toxicidade para os microcrustáceos utilizados (*Artemia* sp e *D. magna*) nos testes preliminares e, desta forma, foi excluído dos ensaios posteriores.

Já a quitosana pulverizada em suspensão aquosa (QTS3) apresentou eficiência na remoção da cor (Tabelas 7 e 8) sem alterar o pH do efluente remediado (Tabela 9). Da mesma forma, Kimura (2001) verificou que a adsorção de corantes têxteis foi maior utilizando quitosana pulverizada comparativamente ao uso de microsferas de quitosana na remoção da cor de corantes têxteis.

Com respeito à avaliação toxicológica de efluentes industriais, os parâmetros físico-químicos avaliados na presente pesquisa, apresentados nas tabelas 9, 10 e 11; deve-se considerar principalmente o pH, a condutividade e dureza podem afetar a toxicidade de substâncias, incluindo os metais (KNIE; LOPES, 2004).

Graff et al. (2003) demonstraram que os parâmetros condutividade e dureza são fatores que afetam de maneira significativa a toxicidade da água dos rios. Na atual pesquisa, a condutividade do efluente bruto ($4,693 \pm 0,054 \text{ mS.cm}^{-1}$) foi a maior, comparativamente aos demais efluentes estudados (Tabela 11). No entanto, causou alguma surpresa, por ser maior do que algumas amostras de chorume de um aterro sanitário municipal, estudadas por Sisinni et al. (2000). Estas apresentaram

valores entre 3,09 e 6,20 mS.cm⁻¹ e dureza de 60 a 95 mg.L⁻¹ de CaCO₃, que contribuíram para causar toxicidade elevada a *Danio rerio* após 48 h de exposição.

Apesar da remediação com quitosana (QTS3) ter reduzido sensivelmente a dureza do efluente remediado, ele apresentou valor acima daqueles obtidos por Sisino et al. (2000) para chorume de aterro sanitário. Isto revelou outro aspecto curioso dos efluentes têxteis: a dureza causada pela adição de sais durante o processo têxtil. Entre estes sais encontram-se o fosfato dissódico e bicarbonato de sódio (SENAI; CETIQT; GTZ, 1998); silicato de sódio, polifosfatos, fosfato de amônia, cloreto de amônia e cloreto de magnésio (VANDEVIVERE; BIANCHI; VERSTRAETE, 1998); além de dicromato de potássio, cloreto de ferro (III) e nitrito de sódio (PERUZZO, 2003) e também permanganato de potássio (ASCHNER; LUKEY; TREMBLAY, *in press*).

A dureza total da água pode influenciar de maneira significativa, tanto o comportamento como a sensibilidade das espécies-teste. Águas que apresentem dureza baixa em combinação com valores de pH decrescentes (a partir pH 6,9), aumentam a biodisponibilidade de metais (KNIE; LOPES, 2004).

Para os testes com peixes, Knie e Lopes (2004) recomendam que sejam utilizadas apenas águas com dureza na faixa de 250 mg.L⁻¹ de CaCO₃. Segundo estes autores, a norma ISO 7346 (1996) determina que o cultivo desta espécie pode ser realizado em águas com dureza de até 300 mg.L⁻¹. Por outro lado, segundo a norma 15088 da ABNT (2004) para *Danio rerio*, os valores de dureza para o cultivo devem estar entre 10 e 60 mg.L⁻¹ de CaCO₃ e entre 40 e 48 mg.L⁻¹ de CaCO₃ para a água de diluição. Na presente pesquisa optou-se por utilizar a água de torneira com a dureza apresentada (120,15 ± 7,70 mg.L⁻¹ de CaCO₃) (Tabela 11), tanto no cultivo

como na diluição das amostras utilizadas nos ensaios, em função de Knie e Lopes (2004) terem chamado a atenção sobre o fato de que em Santa Catarina, muitas águas apresentam dureza muito próxima ou acima de 100 mg.L^{-1} de CaCO_3 . Além disto, o cálcio é um elemento essencial para o desenvolvimento dos peixes. A dureza da água utilizada apresentou valor bem menor do que os limites estabelecidos para a potabilidade de águas (500 mg.L^{-1}) (BRASIL; FUNASA, 2001).

No local de lançamento de efluentes pode haver um enriquecimento de nutrientes, conforme foi demonstrado em um estudo, no qual carpas (*Cyprinus carpio*) que foram expostas a efluentes contendo substâncias tóxicas, apresentaram crescimento em comparação ao grupo controle. Este crescimento pode ser explicado graças aos nutrientes contidos nos efluentes que causam um enriquecimento orgânico e, conseqüentemente, um aumento nos níveis de nutrientes disponíveis no local onde forem lançados (SMOLDERS; BERVOETS; BLUST, 2004).

No entanto, os efluentes podem causar toxicidade variável de acordo com o tempo de exposição, pois as substâncias presentes nos efluentes podem ser degradadas ou transformadas pelos organismos expostos (SISINNO et al., 2000).

Além disso, deve-se ter em conta que as misturas complexas de corantes e dos produtos da degradação dos mesmos, presentes nos efluentes estudados na atual pesquisa, podem causar toxicidade aos organismos (PINHEIRO; TOURAUD; THOMAS, 2004).

A toxicidade observada na presente pesquisa poderia ser relacionada aos parâmetros físico-químicos anteriormente discutidos e à presença de cor no efluente têxtil não remediado que pode ser atribuída à presença de vários corantes utilizados

no processo de tingimento na indústria têxtil em estudo. Conforme ressaltado por Oh et al. (1997), os corantes reativos e os demais corantes que apresentam grupo azo, ao sofrerem clivagem redutiva química ou enzimática originam as amins aromáticas. Algumas destas foram consideradas como carcinogênicas (PINHEIRO; TOURAUD; THOMAS, 2004).

Apesar de que na presente pesquisa não foram efetuadas análises para verificação dos níveis de amins aromáticas em nenhum dos efluentes estudados, pode-se especular que parte da toxicidade, particularmente a genotoxicidade, verificada nos efluentes poderia ser atribuída à presença destas amins nos efluentes não remediados (EB) e nos remediados (ETE e QTS3).

Para reduzir o conteúdo de corantes nos efluentes Bastian, Santos e Ferrari (2001) recomendam o uso de corantes que apresentem maior capacidade de retenção à fibra têxtil, evitando-se ou até mesmo reduzindo-se o uso de corantes que apresentam baixa porcentagem de retenção à fibra têxtil. A porcentagem de retenção do corante no banho determina o quanto será retido na fibra têxtil e, conseqüentemente, o quanto será perdido no efluente que resulta do processo de tingimento. Estes autores ressaltam ainda que devem ser substituídos ou evitados os corantes que apresentarem toxicidade aos organismos aquáticos, como no caso daqueles que apresentam metais ou enxofre em sua estrutura. E os autores concluem que devido à presença destes corantes nos efluentes que chegam à estação de tratamento, o teor de enxofre no efluente aumenta muito e, através da redução dos sulfatos a sulfetos, forma-se gás sulfídrico, que é tóxico para os organismos e corrosivo para as tubulações.

Como verificado em vários trabalhos, a quitosana apresenta a capacidade de remover a cor de soluções aquosas devido aos grupos funcionais amino e hidroxil que existem em sua molécula. Estes grupos conferem ao biopolímero e polieletrólito quitosana elevada afinidade por muitas classes de corantes, incluindo os corantes dispersos, diretos, reativos, aniônicos, à cuba e ao enxofre; no entanto, conferem a este biopolímero baixa afinidade por corantes catiônicos (CHAO et al., 2004; CHIOU; LI, 2002; WU; TSENG; JUANG, 2001). Uma vez que na presente pesquisa a remoção de cor obtida através da remediação com quitosana não foi completa, pode-se supor que isto se deu provavelmente em função da baixa afinidade que a quitosana pode apresentar por corantes catiônicos, conforme ressaltado no trabalho de Chao et al. (2004).

Na presente pesquisa a remediação com quitosana pulverizada (QTS3) também mostrou maior efetividade na remoção dos metais (Al, Co, Cr, Fe, Li, Mg, Mn, Mo, Pb, Rb e Th), comparativamente à remoção por processo microbiológico e físico-químico efetuado pela empresa (ETE), conforme pode ser verificado na tabela 10.

Vários estudos apontaram a quitosana como bom agente quelante de metais pesados como mercúrio, cromo, cobre e íons metálicos (EIDEN; JEWELL; WIGHTMAN, 1980; JANSSON-CHARRIER et al., 1996; WU; TSENG; JUANG, 2001; JUANG; SHAO, 2002).

Fávere et al. (2004) verificaram a remoção de ferro (III) utilizando microsferas de quitosana na remediação de efluentes de mineração de carvão, ricos em Fe, Mn e Al. Da mesma forma, Laus et al. (2006) também utilizando microsferas de quitosana verificaram a remoção de ferro (III) e de manganês (II) de águas

contaminadas pela mineração de carvão. Já Valentini et al. (2000) verificaram a adsorção de Cu(II) e Ni(II) por cápsulas de quitosana e polivinilálcool (PVA). Fávère (1994) verificou a adsorção dos íons Cu(II), Cd(II), Ni(II), Pb(II) e Zn(II) pelo biopolímero quitina, quitosana e pelas quitosanas modificadas.

Os níveis de metais encontrados em todos os efluentes estudados na presente pesquisa (Al, Co, Cr, Fe, Li, Mg, Mn, Mo, Pb, Rb, Th) também foram inferiores comparativamente aos determinados para outros efluentes têxteis estudados por Baptista (2001), nos quais a autora verificou a presença de Al, Cu, Pb, Zn e Cr.

As principais fontes industriais de cromo são as empresas que produzem corantes, as tinturarias e as indústrias têxteis (IARC,1990), o que pode explicar a presença de cromo na presente pesquisa. Similarmente, Baptista (2001) e Smith (1990) encontraram este elemento em estudos realizados com diferentes efluentes têxteis.

O chumbo encontrado na presente pesquisa pode originar-se dos compostos de chumbo utilizados como pigmentos em tintas e corantes (ABADIN et al., 2005). A exposição aos compostos de chumbo, por sua vez, pode aumentar o risco de câncer devido ao acúmulo de Pb nos ossos ou no leite materno (ETTINGER et al., 2004).

Entre os efluentes têxteis estudados por Smith (1990), antes de receberem qualquer forma de tratamento, foram verificadas as presenças dos metais Cd, Cu, Hg e Zn. Porém, estes metais não foram detectados na presente pesquisa em todos os efluentes estudados.

Na atual pesquisa, foram verificadas concentrações diferentes de metais sendo em geral maiores no efluente EB, embora alguns metais tenham apresentado elevação no efluente ETE e tenham sido sempre menores no efluente QTS3, indicando que os processos de remediação tiveram eficácia diferenciada na remoção de metais do efluente final.

Portanto, é importante ressaltar que do ponto de vista qualitativo, no efluente QTS3 houve a diminuição de todos os metais enquanto no ETE houve o aumento de alguns metais (Co, Mg, Pb, Rb e Th) (Tabela 10), provavelmente em função do acréscimo de polieletrólito ou descolorante (resina) no decantador terciário (Figura 4).

Com relação aos metais Al, Co, Cr, Fe, Mg, Mn, Mo, Pb, Rb e Th, Smith (1990) verificou valores muito maiores comparativamente aos encontrados para estes metais na presente pesquisa. Embora este autor não tenha detectado lítio (Li) em todas as amostras estudadas, este metal foi detectado na presente pesquisa nos efluentes EB e ETE (Tabela 10) provavelmente devido ao fato deste elemento ser utilizado como agente promotor de inibição da corrosão em sistemas de resfriamento (CrLi_2O_2) ou como umectante em sistemas de ar condicionado (LiBr) (BIRCH, 1988; LÉONARD; HANTSON; GERBER, 1995).

Na presente pesquisa, o lítio (Li) (Tabela 10) apresentou valores muito abaixo do máximo permitido para o lançamento de efluentes, que é de $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ (CONAMA, 2005); embora haja certa controvérsia estudos apontam para possíveis efeitos teratogênicos associados à exposição a compostos de lítio (LÉONARD; HANTSON; GERBER, 1995).

Os efluentes em estudo são despejados após prévio tratamento na microbacia do Rio Itajaí, cujas águas são captadas para abastecimento público. Então este rio, dentro de sua microbacia, pode ser enquadrado ao longo de seu percurso nas classes I, II e III da Resolução CONAMA (2005). Por esta razão, efetuou-se a comparação entre os valores obtidos para a concentração de metais nos efluentes e os valores máximos permitidos para lançamento no corpo receptor, apresentados na tabela 20.

Tabela 20 – Concentração máxima de metais permitida para lançamentos em corpos de água doce (Classes I, II e III) e para lançamento de efluentes industriais (CONAMA, 2005), em ppm ($\mu\text{g. L}^{-1}$).

Metais	Padrões (valor máximo $\mu\text{g.L}^{-1}$)		
	Águas doces Classes I e II	Águas doces Classe III	Lançamento de Efluentes
Al	100,0	200,0	n.c.
Cd	1,0	10,0	200,0
Co	50,0	200,0	n.c.
Cr	50,0	50,0	500,0
Cu	9,0	13,0	1000,0
Fe	300,0	5000,0	15000,0
Hg	0,20	2,0	10,0
Li	2500,0	2500,0	2500,0
Mg	n.c.	n.c.	n.c.
Mn	100,0	500,0	1000,0
Mo	n.c.	n.c.	n.c.
Pb	10,0	33,0	500,0
Rb	n.c.	n.c.	n.c.
Th	n.c.	n.c.	n.c.
Zn	180,0	5000,0	5000,0

n.c. = nada consta

Apesar de que, nesta pesquisa, ser abordado apenas o monitoramento do tratamento de efluentes industriais, deve-se ter em mente que, quando os efluentes são lançados nos rios eles afetam a qualidade das águas dos mesmos. As águas

dos rios são utilizadas para abastecimento público, somente após tratamento convencional ou avançado (CONAMA, 2005). Desta forma, a presença de substâncias tóxicas na água bruta que é captada para tratamento deve ser também monitorada.

Os metais Al, Co, Mg, Mo, Rb e Th não foram contemplados na Resolução do CONAMA (2005), o que causa certa preocupação, uma vez que entre os efeitos tóxicos associados aos metais podem estar envolvidos neurotoxicidade e a hepatotoxicidade; além de ser obrigatório efetuar-se uma avaliação da toxicidade aguda para peixes de água doce (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY - USEPA, 1991).

Estudos indicam que o Al pode influenciar a homeostase do Fe, e também pode contribuir para a toxicidade sobre células nervosas nas quais o dano tenha sido induzido por radicais livres mediados pelo Fe (STOHS; BAGCHI, 1995); o Al também foi associado à osteoporose e ao mal de Alzheimer (KISNIERIENĒ; SAKALAUŠKAS, 2005); o cobalto (Co) pode afetar a transmissão neuromuscular (FAROON et al., 2004); os efeitos tóxicos do magnésio (Mg) são dose-dependentes e ocorrem principalmente nos sistemas cardiovascular e nervoso (TOFIL; BENNER; WINKLER, 2005); o tório (Th) pode acumular-se nos ossos segundo Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) ligada ao Center of Disease Control (CDC) norte americano (ATSDR, 1990); com relação ao rubídio (Rb) estudos demonstraram que a exposição conjunta ao chumbo (Pb) levou ao aumento da concentração do Rb sanguíneo (SINGH et al., 1994) e, a exposição tanto ao Rb quanto ao Lítio causou lesões renais em roedores (BERTELLI et al., 1985).

Na presente pesquisa o magnésio foi o elemento que apresentou maiores valores em todos os efluentes, embora tenha sido maior no efluente ETE. Isto ocorreu provavelmente em função da adição de compostos que apresentam este elemento durante o tratamento dos efluentes ou ainda devido à adição de sais de magnésio durante o processo têxtil (VANDEVIVERE; BIANCHI; VERSTRAETE, 1998), o que pode explicar sua presença no efluente EB.

Smith (1990) menciona que uma quantidade razoável de contaminação presente nos efluentes têxteis pode originar-se do próprio substrato como no caso das fibras celulósicas (algodão), pois estas apresentam altos níveis de vários contaminantes metálicos provenientes de fungicidas. Este autor refere-se ao fato de que os contaminantes, normalmente, se desprendem durante o processo de beneficiamento das fibras.

A presença do Mn nos efluentes da indústria têxtil em estudo poderia ser devida ao uso de fungicidas à base de manganês (Mn) no cultivo de algodão (SMITH, 1990) ou ao uso de permanganato de potássio para remoção de odores dos efluentes (ASCHNER; LUKEY; TREMBLAY, *in press*).

É importante lembrar ainda que a exposição contínua ao manganês pode levar a alterações neurofuncionais e a uma condição neurológica crônica denominada como manganismo (MERGLER, 1999).

A Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) através da Portaria nº 1469 de 2000 determinou os padrões de potabilidade da água para consumo humano (BRASIL; FUNASA, 2001). Nesta portaria foi apresentando o valor máximo permitido para as substâncias inorgânicas com potencial tóxico que podem estar presentes na água potável. Foram propostos os valores máximos permitidos para o alumínio (0,2

mg.L⁻¹), o cádmio (0,005 mg.L⁻¹), o cromo (0,05 mg.L⁻¹), o cobre (2,0 mg.L⁻¹), o ferro (0,3 mg.L⁻¹), o mercúrio (0,001 mg.L⁻¹), o manganês (0,1 mg.L⁻¹) e o chumbo (0,01 mg.L⁻¹), entre outros.

No caso da presente pesquisa, diferentes efluentes contendo misturas complexas de metais podem ocorrer variações, conforme ressaltado por Roney e Colman (2004). Tais variações podem contribuir para os efeitos tóxicos sobre os organismos expostos como é possível discernir ao serem observados os resultados obtidos em várias pesquisas realizadas sobre a toxicidade de metais, principalmente no caso do alumínio e seus compostos.

O alumínio é o primeiro metal e o terceiro elemento químico mais abundante na crosta terrestre, depois do oxigênio e do silício. Trata-se de um elemento muito reativo que nunca é encontrado como metal livre na natureza. Este elemento combina-se com outros, formando compostos que podem ser encontrados na água em sua forma iônica. Os compostos de alumínio apresentam muitas e importantes aplicações, entre as quais se destaca o emprego em tratamento de água. A concentração de alumínio em águas naturais, assim como na água potável, é baixa (<0,1 ppm), exceto em águas muito ácidas nas quais o alumínio pode se dissolver. Entretanto, o alumínio dissolvido na água causa toxicidade para organismos aquáticos incluindo os peixes (KEITH et al., 1999). O valor máximo ou limite de concentração permitido na água para consumo humano estabelecido para o Al na água é de 0,2 mg.L⁻¹ (BRASIL; FUNASA, 2001).

Já na presente pesquisa, o nível maior de alumínio encontrado no efluente proveniente do tratamento convencional (ETE), certamente deve-se à utilização de sulfato de alumínio na empresa têxtil em estudo (Figura 4).

Por outro lado, a toxicidade do alumínio e a acumulação ao longo prazo tem sido apontadas como uma das possíveis causas da osteoporose e do mal de Alzheimer. Também no meio ambiente a liberação deste metal do solo pela chuva ácida tem afetado seriamente as florestas e a vida aquática (KISNIERIENĖ; SAKALAUŠKAS, 2005).

Na presente pesquisa todos os efluentes estudados apresentaram níveis muito baixos de metais, especialmente o efluente remediado com quitosana QTS3, cujos valores foram os menores. Em todos os casos os valores estavam abaixo dos máximos permitidos para lançamento de efluentes em corpo de água receptor, segundo CONAMA (2005), o que pode ser constatado comparando-se as tabelas 10 e 20. No entanto, os efluentes tratados ainda podem causar toxicidade aos organismos aquáticos (BAPTISTA et al., 2002).

Como a quitosana apresenta capacidade de remover cor e metais em soluções aquosas, e com base nas características da quitosana pulverizada, pode-se considerar que esta atende a alguns dos critérios utilizados em uma avaliação preliminar que deve ser efetuada antes do uso de substâncias químicas, segundo recomendado por Smith (1990). Este autor estabeleceu tais critérios de maneira a promover uma redução no potencial poluidor de produtos a serem empregados em indústrias têxteis.

Entre os critérios de Smith (1990) que podem ser aplicados à quitosana pulverizada encontram-se o desempenho, a biodegradabilidade, a baixa toxicidade e, conseqüentemente, menor risco para o operador do sistema de tratamento e para o consumidor final da água tratada com este coagulante conforme demonstrado nos trabalhos de Kimura (2001) e Spinelli (2001).

Outro aspecto que justificaria o uso de quitosana pode ser encontrado em um estudo de Cheng et al. (2005). Estes autores verificaram a viabilidade econômica do emprego de quitosana dissolvida em ácido acético (6 %) utilizada no tratamento de efluentes. A quitosana empregada como coagulante foi mais efetiva em remover partículas coloidais orgânicas em suspensão existentes em efluentes de cervejaria. A remoção de 95 % de turbidez foi atingida com o uso de 120 mg de quitosana por litro. Segundo estes autores, tal eficiência na remoção pode ser devida aos grupos funcionais (cargas positivas na superfície da quitosana em pH baixo), ou ainda em função do tamanho das partículas em suspensão, uma vez que colóides podem ligar-se à superfície da quitosana. Por outro lado, os autores ressaltam que para obter resultado semelhante com o coagulante sulfato de alumínio, foram necessários 350 mg. Cheng e colaboradores consideraram que levando em conta as relações de custo e benefício, o emprego da quitosana revelou-se mais vantajoso no caso do pré-tratamento de efluentes gerados em algumas das etapas da produção da cervejaria, além de não ter sido necessário o ajuste do pH do efluente, o qual foi mantido em 4,5. Após o tratamento do efluente os sólidos em suspensão adsorvidos na quitosana formaram-se 15 g de resíduo seco por litro. Este resíduo, segundo os autores, pode ser vendido para obtenção de ração animal e, desta forma, compensar os gastos com a aquisição de quitosana. Para uma produção de 200 toneladas de efluentes/dia são necessários 24 kg de quitosana, e são produzidas 3 toneladas de resíduos secos.

Portanto, apesar da quitosana ser aproximadamente de 10 vezes mais cara do que o sulfato de alumínio, seu uso torna-se economicamente viável quando os resíduos gerados são empregados em outro processo produtivo (CHENG et al., 2005).

Desta forma, a viabilidade da utilização da quitosana pode ser apoiada pelos resultados de Cheng et al. (2005), como também pelos resultados obtidos na presente pesquisa, na qual houve uma remoção de $80,76 \pm 1,00$ % da cor de efluente têxtil utilizando 18,7 g de quitosana por litro (QTS3), sem a necessidade do ajuste do pH, o que representa redução de custos.

Por outro lado, a quitosana é um biopolímero altamente biodegradável e aumenta a degradabilidade de compostos que estejam ligados a ela (USTINOV et al., 2004), o que constitui outra vantagem quando se considera que o lodo gerado na remediação dos efluentes poderia ser descartado nos aterros sanitários com menor risco ambiental. Isto seria possível tendo-se em vista que a disposição final em aterros do lodo gerado através do tratamento de água com quitosana não representa prejuízo ambiental, conforme ressaltado por Spinelli (2001).

Para avaliar os efeitos que misturas de corantes causam em organismos aquáticos, devem ser empregados conjuntamente diferentes organismos-teste de forma a obter-se um quadro mais completo dos efeitos que determinadas substâncias, misturas complexas ou efluentes podem causar em diferentes níveis tróficos conforme ressaltado por Baptista (2001).

A toxicidade de corantes foi determinada através da exposição de larvas de *Artemia salina*, em diferentes intervalos de tempo (0, 6, 12 h) às diferentes concentrações do corante cristal violeta diluído em água do mar. Na concentração de 115 mg.L^{-1} (24 h), o corante cristal violeta apresentou importante toxicidade para *A. salina* (EL-NAGGAR; EL-AASAR; BARAKAT, 2004).

Similarmente, na presente pesquisa após a exposição dos náuplios de *Artemia* sp estes apresentaram sensibilidade já nas primeiras 24 h de exposição ao efluente não remediado (EB), porém os demais efluentes remediados (ETE e QTS3) não causaram toxicidade a estes microcrustáceos, conforme pode ser verificado nas tabelas 12 e 14. De forma similar, El-Naggar; El-Aasar e Barakat (2004) verificaram que os produtos da degradação do corante cristal violeta por *Pseudomonas aeruginosa* em bioreator aerado não foram tóxicos para *A. salina*.

Estudos com larvas de artêmias com 24, 48 e 72 h de vida demonstraram que a sensibilidade aos produtos químicos difere com a idade; sendo que as larvas com 72 h apresentam maior sensibilidade (BARAHONA; SÁNCHEZ-FORTÚN, 1996; FORTÚN et al., 1997). Corroborando estes dados, Benassi (2004) verificou que náuplios expostos por 48 h foram sensíveis a um efluente rico em metais.

Comparativamente, na presente pesquisa a maior toxicidade do efluente têxtil não remediado (EB) levou à imobilidade já nas primeiras 24 h de exposição e, no mesmo período, o efluente remediado com QTS3 não causou toxicidade para os náuplios. Resultado semelhante foi observado em 48 h, indicando que este estágio também não apresentou sensibilidade.

Embora o efluente não remediado (EB) tenha apresentado níveis baixos de metais, pode-se supor que os náuplios de *Artemia* sp também foram sensíveis aos mesmos.

Na presente pesquisa, os náuplios de *Artemia* sp expostos ao efluente não remediado (EB) foram mais sensíveis já nas primeiras 24 horas de exposição, comparativamente aos microcrustáceos de água doce (*D. magna*), expostos ao

mesmo efluente. No entanto, os náuplios de *Artemia* sp não foram sensíveis aos efluentes ETE e QTS3, sendo que apenas os efluentes EB e ETE causaram toxicidade aos juvenis de *D. magna* (Tabela 15).

Similarmente, Benassi (2004) também verificou que os náuplios de *A. salina* mostraram-se um pouco mais sensíveis que as formas juvenis de *D. magna*, quando expostos a efluentes de mineração de carvão ricos em metais. Por outro lado, Silva, Dezotti e Sant'Anna Júnior (2004) também verificaram que indivíduos de *A. salina* apresentaram menor sensibilidade, comparativamente aos juvenis de *D. similis* expostos a chorume de aterro sanitário.

Em estudos de toxicidade aguda utilizando o organismo-teste *D. similis*, realizados com dois esgotos distintos provenientes de uma planta de tratamento de água que utiliza alumínio e de outra planta que utiliza cloreto férrico, foi observado que estes não causaram toxicidade aguda aos microcrustáceos. O sulfato de alumínio $[Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O]$ e cloreto férrico $(FeCl_3 \cdot 6H_2O)$ são substâncias químicas utilizadas normalmente como coagulantes primários em estações de tratamento de água, durante o processo de floculação/decantação. No entanto, após exposição crônica (14 dias), verificou-se que ambos os esgotos causaram redução na taxa de reprodução, enquanto o esgoto contendo cloreto férrico causou alguma mortalidade (SOTERO-SANTOS; ROCHA; POVINELLI, 2005).

Na presente pesquisa, na exposição aguda de indivíduos jovens de *D. magna* verificou-se que o efluente não remediado apresentou toxicidade com fator de diluição $FD=2$, porém o efluente remediado ETE causou maior toxicidade aos organismos expostos com $FD=4$, acima do determinado pela FATMA (2002). Por outro lado, o efluente QTS3 não causou toxicidade aos organismos-teste, o que

indica que a remediação com quitosana foi mais eficaz na redução da toxicidade dos efluentes têxteis.

Resultados similares foram obtidos por Baptista et al. (2002), que também verificaram que o efluente têxtil não tratado causou toxicidade para *D. magna* ($CE_{50} = 2,25 \%$), embora o efluente tratado em lagoas de estabilização não tenha sido tóxico para estes organismos, ao contrário da presente pesquisa na qual o efluente ETE foi mais tóxico para estes organismos. Portanto, os valores das concentrações efetivas (CE_{50}) apresentados por Baptista et al. (2002) para o efluente têxtil foram muito menores do que os obtidos na presente pesquisa para o EB ($CE_{50} = 49,98 \%$) e para ETE ($CE_{50} = 49,80 \%$). O que sugere que os efluentes têxteis EB e ETE em estudo apresentaram menor toxicidade de uma maneira geral e comparativamente aos estudados por Batista e colaboradores.

Isidori et al. (*in press*) verificaram a toxicidade de alguns surfactantes utilizando *D. magna* e *Ceriodaphnia dubia*. Estes autores observaram que, tanto na exposição aguda de *D. magna* (24 h) quanto na crônica de *C. dubia* (7 dias), houve toxicidade para os microcrustáceos, porém recomendaram os testes crônicos por serem mais significativos em termos de concentrações efetivas.

Comparando os resultados da presente pesquisa obtidos com *D. magna* para os efluentes não remediados e remediados (Tabelas 12 e 15) aos resultados obtidos por Isidori et al. (*in press*) para os surfactantes, estes últimos foram mais tóxicos, com CE_{50} bem menores ($CE_{50} = 0,09$ a $1,20 \%$).

Na presente pesquisa, a toxicidade dos efluentes não remediados (EB) e remediados (ETE e QTS3) também foi avaliada através de um microrganismo teste

(*Vibrio fischeri*) (Tabela 14), que é um bioindicador bioluminescente com inúmeras aplicações biotecnológicas (NUNES-HALLDORSON; DURAN, 2003).

As bactérias bioluminescentes (*V. fischeri*) emitem luz em condições ambientais favoráveis, porém na presença de substâncias tóxicas a bioluminescência é reduzida. A diminuição da intensidade de luz é proporcional à toxicidade da amostra testada e está associada com a inibição de processos metabólicos das bactérias (KNIE; LOPES, 2004).

Na presente pesquisa nenhum dos efluentes remediados (ETE e QTS3) apresentou toxicidade (FD=1) para *V. fischeri*. No entanto, o efluente têxtil EB, como esperado, causou forte inibição na bioluminescência das bactérias (FD=64), muito acima do permitido (FD=2) para o lançamento de efluentes têxteis nos corpos de água receptores, segundo determinado pela Portaria nº 17 (FATMA, 2002). Da mesma forma, Baptista et al. (2002) e Wang et al. (2002) verificaram resultados similares aos da presente pesquisa relativamente ao efluente não tratado e a corantes, respectivamente; que também foram tóxicos para as bactérias. Embora Baptista et al. (2002) tenham apontado as *V. fischeri* como sendo mais sensíveis do que os demais organismos empregados, isto não ocorreu no caso da presente pesquisa, onde apesar destas bactérias não terem sido afetadas pelo ETE após exposição aguda (30 min), este causou maior toxicidade em *D. magna* e em *D. rerio*.

Por outro lado, remediação com quitosana apresenta algumas vantagens sobre a biorremediação utilizando fungos. Entre as quais, pode-se destacar o fato de que a quitosana ter apresentado uma rápida atuação (24 h) com a remoção de $80,76 \pm 1,0$ % da cor de um efluente têxtil complexo contendo uma mistura de vários corantes e de outras substâncias, como no caso verificado na presente pesquisa

(Tabela 7) e por Kimura (2001). Balan e Monteiro (2001) conseguiram após 24 h, que é o tempo de retenção normalmente empregado nas indústrias, obter a remoção de 64 % da cor do corante com *Phellinus gilvus*, de 75 % com *Pleurotus sajor-caju*, e de 70 % com *Pycnoporus sanguineus*.

Entre os aspectos que dificultam o emprego de fungos em sistema de tratamento de efluentes têxteis destaca-se metabolismo destes organismos. Apesar de serem capazes de removerem a cor por mineralização enzimática (ZHENG et al., 1999); por biosorção (CONNELLY; SMYTH; MACMULLAN, 1999; ZHENG et al., 1999); por biodegradação (CONNELLY; SMYTH; MACMULLAN, 1999); ou ainda por promoverem esta remoção por um ou mais destes processos (COULIBALY; GOURENE; AGATHOS, 2003). Sua capacidade de metabolizar substâncias depende de suas condições fisiológicas, dos nutrientes disponíveis e do crescimento de sua biomassa (CONNELLY; SMYTH; MACMULLAN, 1999). Desta forma, essa capacidade pode ser atingida apenas após um determinado período de tempo de crescimento, que pode levar até duas semanas (BALAN; MONTEIRO, 2001; VILLELA et al., 2005). Por outro lado, quando se emprega a quitosana pulverizada na remoção de cor não existem tais problemas, uma vez que se trata de um material de ação imediata (KIMURA, 2001).

Buscando-se verificar a toxicidade de efluentes têxteis sobre vegetais na presente pesquisa foram efetuados ensaios com sementes e bulbos de *Allium cepa*.

Nos ensaios com sementes, estas foram expostas aos efluentes têxteis não remediados (EB) e remediados (ETE e QTS3), que também continham uma mistura complexa de substâncias (corantes, metais, surfactantes, etc.). Embora não se tenham realizado ensaios de bioacumulação com as sementes ou com as plântulas,

trabalhos anteriores demonstraram que as plantas expostas a ambientes contaminados com metais sofrem estresse (PIP, 1993) e podem acumular em seus tecidos alguns destes metais (NOGAWA et al., 1989).

Considerando os resultados da presente pesquisa, pode-se perceber que houve uma resposta muito parecida entre o controle negativo e os efluentes estudados (EB, ETE e QTS3), tanto em termos de inibição da germinação quanto na inibição do crescimento das plântulas, conforme pode ser verificado na tabela 16. Isto poderia ter acontecido devido ao curto período de exposição de apenas 12 dias, além de que as sementes não foram pré-embebidas. Embora Gallego, Benavides e Tomaro (1996) tenham verificado os efeitos morfológicos do estresse após 4 dias de exposição, as mudas estavam em um estágio de desenvolvimento mais avançado, ou seja, já contavam com 21 dias desde a germinação.

Na presente pesquisa, nos ensaios conduzidos com bulbos de *Allium cepa*, verificou-se o alongamento das raízes expostas aos efluentes EB, ETE e QTS3. No período de exposição (3 dias) não houve diferenças estatísticas entre os resultados obtidos com relação ao EB. Porém, houve uma maior inibição do crescimento das raízes dos bulbos expostos ao efluente ETE do que a verificada nos bulbos expostos ao efluente QTS3 (Tabela 17). É importante observar que a concentração de alumínio presente no efluente ETE foi aproximadamente três vezes maior do que a de QTS3. Estes resultados sugerem que o ensaio de inibição de crescimento de raízes de bulbos apresentou mais sensibilidade do que o ensaio conduzido com sementes e plântulas de *A. cepa*. Da mesma forma, Zhang e Zhou (2005) consideraram que o crescimento de raiz foi um indicador mais sensível do que a germinação das sementes. Estes autores verificaram os efeitos tóxicos causados por

coagulantes a base de alumínio: o cloreto de alumínio (AlCl_3) e o cloreto de polialumínio (CPA), este último apresentou toxicidade para ambos vegetais em condições neutras. Os autores observaram ainda que ambos coagulantes causaram redução no crescimento de raízes de *Brassica chinensis* e *Raphanus sativus*. Em condições neutras, *R. sativus* foi mais sensível aos efeitos tóxicos de AlCl_3 , e *B. chinensis* foi mais sensível a este coagulante em pH ácido.

O sinal mais importante da toxicidade do alumínio para as plantas é a inibição do crescimento de raízes (VAN SCHÖLL et al., 2004). A toxicidade deste metal pode ser associada à ação que seus íons exercem sobre a parede celular e sobre a membrana plasmática das células em desenvolvimento na raiz (AHN et al., 2002). Verificou-se que o Al^{3+} induziu mudanças no potencial de membrana plasmática de células de *Nitellopsis obtusa*, provavelmente por afetar a homeostase de Ca^{2+} (KISNIERIENĖ; SAKALAUŠKAS, 2005).

Nos ensaios, tanto com sementes quanto com bulbos de *Allium cepa*, na presente pesquisa utilizou-se como controle positivo o dicromato de potássio, em função do mesmo ser utilizado na indústria têxtil como oxidante (PERUZZO, 2003). O dicromato de potássio ($1,75 \text{ mg.L}^{-1}$) causou forte inibição na germinação das sementes, no desenvolvimento das plântulas e no alongamento de raízes de bulbos, o que sugere que o uso de dicromato de potássio mesmo em menores concentrações na indústria têxtil poderia representar um risco para as plantas aquáticas, e mesmo aquelas cultivadas com água retirada de rio que tenha recebido efluentes contendo dicromato de potássio.

A presente pesquisa, nos peixes (*D. rerio*) expostos por 48 h em ensaio agudo estático aos efluentes ETE e QTS, não houve morte em nenhuma das

concentrações testadas. No entanto, após 24 h de exposição ao efluente EB, houve mortalidade total de peixes expostos a todas as concentrações superiores a 20 %, o que indica a toxicidade do mesmo. Desta forma, os ensaios conduzidos para a determinação das defesas antioxidantes e genotoxicidade dos efluentes foram efetuados com a concentração de 20 %. A renovação diária dos efluentes foi necessária para reduzir o acúmulo de substâncias geradas pelo metabolismo dos animais, bem como para garantir certa uniformidade na composição das substâncias presentes nos efluentes utilizados nos ensaios, já que estas substâncias podem ser degradadas ou biotransformadas pelos organismos expostos (SISINNO et al., 2000).

As misturas das substâncias presentes em efluentes têxteis podem determinar o aumento da toxicidade sobre os peixes, conforme verificado por Meinelt et al. (2001). Estes autores constataram que o Ca^{2+} influencia diretamente a toxicidade induzida por corante na presença de substâncias húmicas. Já alguns dos corantes utilizados na indústria têxtil apresentam metais em sua estrutura (ZOLLINGER, 1991); os quais além de causarem poluição afetando o ambiente podem se acumular nos tecidos dos peixes (DEMIRAK et al., *in press*).

Além disso, Smith (1990) verificou em efluentes têxteis que, além de misturas de corantes, também foram detectadas misturas de compostos fenólicos que apresentaram toxicidade para os organismos aquáticos.

Sob condições de estresse, os peixes podem reagir fugindo ou podem sofrer um processo de adaptação através de enzimas de defesa. Em peixes, o tipo de resposta quantitativa com relação às defesas antioxidantes aparentemente depende do tempo de exposição e dos níveis de poluição. Esta resposta ocorre de acordo

com a capacidade funcional dos órgãos e tecidos envolvidos (WILHELM FILHO et al., 2001).

Portanto, existe a resposta celular ao estresse (RCE) que constitui um mecanismo universal representado por uma reação de defesa da célula aos danos que forças do meio ambiente causaram em macromoléculas. No entanto, muitos aspectos da RCE não são específicos ao tipo de agente estressor porque as células monitoram o estresse com base nos danos causados nas macromoléculas sem considerar o tipo de estressor que produziu o dano. Então, o estudo dos mecanismos de adaptação ao estresse e aos ambientes extremos pode nos fornecer a base para o monitoramento de mudanças que estejam ocorrendo no meio (KÜLTZ, 2005).

Como consequência direta da exposição de células a alguns tipos de estresse, ocorrem eventos moleculares que resultam no aumento na geração de EROs. Isto ocorre no caso de exposição a agentes estressores, como substâncias químicas altamente reativas. Como a RCE envolve a avaliação e a neutralização do dano induzido pelo estresse, nas células expostas ocorre um aumento temporário da tolerância a tal dano e/ou pode haver uma remoção das células danificadas através da morte celular programada (apoptose) (KÜLTZ, 2005).

Evidências indicam que os metais de transição atuam na deterioração oxidativa de macromoléculas e a toxicidade associada aos mesmos pode ser em parte causada pelo dano oxidativo causado nos tecidos (STOHS; BAGCHI, 1995). Verificou-se que Fe, Cu, Cr, Cd, Hg, Ni e Pb causam depleção da glutatona e dos grupos sulfidrilas das proteínas que resultam na produção de EROs, como

conseqüência ocorre um aumento da lipoperoxidação e de dano ao DNA (STOHS; BAGCHI, 1995).

Em estudos realizados com animais expostos a efluentes provenientes da lixiviação de rejeitos de mineração de carvão, houve um aumento no nível de lipoperoxidação e também de dano ao DNA durante as duas primeiras semanas de exposição, além de uma elevação na expressão de enzimas de estresse oxidativo (catalase e superóxido dismutase), indicando sua toxicidade (BENASSI, 2004).

Wilhelm Filho et al. (2001) também verificaram uma elevação significativa no nível de TBARS de peixes coletados em sítio com contaminação antrópica, em relação ao grupo controle coletado em sítio referência, sem contaminação.

Na presente pesquisa os peixes que foram expostos por 7 dias aos efluentes ETE e EB apresentaram um significativo aumento na lipoperoxidação de membranas (Figura 17). Curiosamente, os animais expostos ao ETE apresentaram um nível de lipoperoxidação relativamente alto em comparação aos animais expostos ao efluente EB, sugerindo uma maior toxicidade do efluente remediado da forma convencional. Já os animais expostos ao efluente QTS3, apresentaram níveis de lipoperoxidação similares ao grupo controle e menores que dos animais expostos ao efluente ETE, o que sugere que no efluente QTS3 houve uma redução significativa de toxicidade para os peixes. Teoricamente, esta menor lipoperoxidação poderia estar associada tanto à redução da concentração de metais quanto de corantes e surfactantes.

Similarmente, Ribeiro et al. (2000) verificaram que o efluente têxtil tratado causou uma elevação nos níveis de TBARS e na concentração de GSH de

Oreochromis niloticus já na primeira semana de tratamento, esta tendência manteve-se até a 4^a semana.

Na presente pesquisa os animais expostos aos efluentes ETE apresentaram uma correlação inversa entre os níveis de GSH e de TBARS, fato que também foi verificado em acarás (*Geophagus brasiliensis*) expostos a ambientes contaminados (WILHELM FILHO et al., 1997).

A ação protetora da GSH previne os danos às membranas celulares e a outras macromoléculas. Esta molécula hidrossolúvel, por ser ubíqua, pode ser encontrada desde os microrganismos, plantas e animais. A GSH é encontrada principalmente no citossol celular e em outras fases aquosas de sistemas vivos, onde desempenha um papel fundamental na regulação do balanço redox. Portanto, pode ser usada como um indicador de estresse oxidativo no processo de detoxificação de xenobióticos (KONISHI et al., 2005; JEFFERIES et al., 2003).

Em um estudo realizado com peixes onde em ambos os tratamentos, tanto a curto quanto em longo prazo, houve uma redução dos níveis de GSH. Supôs-se que, a maior parte dos xenobióticos de origem industrial poderia ter sido detoxificada através da via da GST, capacitando os animais a sobreviverem após a exposição à toxicidade aditiva e/ou sinérgica da mistura de substâncias tóxicas (CHATTERJEE; BHATTACARYA, 1984). Esta diminuição no conteúdo de GSH poderia ser um indício de que, num estresse severo, haja depleção deste tiol devido à perda do mecanismo de adaptação ou devido à oxidação interna da GSH sem haver a reposição de sua forma reduzida (ZHANG et al., 2005).

Jifa et al. (2005) verificaram que o conteúdo de GSH de peixes (*Lateolabrax japonicus*) apresentou um declínio significativo após 6 dias de exposição ao surfactante dodecilbenzeno sulfonato de sódio (DBSS), em relação ao grupo controle; após este período observou-se uma tendência ao aumento na GSH. O tratamento com dodecil sulfato de sódio (DSS), por outro lado, levou a um aumento mais rápido de GSH.

Na presente pesquisa, no final do curto período de exposição (7 dias), pode-se constatar um aumento significativo de GSH nos animais expostos ao efluente não remediado (EB) em relação ao grupo controle, indicando tratar-se de um estado de estresse oxidativo, conforme pode ser observado na figura 18, e confirmado pelos dados obtidos através de TBARS (Figura 19). A elevação dos níveis de GSH poderia ser causada por surfactantes (JIFA et al., 2005), por metais (LANGE; AUSSEIL; SEGNER, 2000), ou por azo corantes que apresentam potencial genotóxico (TSUDA et al., 2000) presentes nos efluentes têxteis. Já os animais expostos ao efluente remediado (QTS3) não apresentaram diferença significativa em relação ao grupo controle, indicando que no processo de remediação com quitosana, houve redução de toxicidade devido à remoção dos vários agentes estressores presentes no efluente.

Desta forma, os resultados confirmam que a GSH é freqüentemente a primeira linha de defesa contra o estresse oxidativo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1998). Os níveis de GSH podem aumentar devido a um mecanismo de adaptação a um estresse oxidativo e, por outro lado, em caso de estresse severo, pode haver supressão dos níveis de GSH devido à perda do mecanismo de adaptação, além de ocorrer predominantemente oxidação da GSH para sua forma oxidada com uma

menor capacidade de regeneração da mesma por processo de redução (ZHANG et al., 2005).

A GSH também está associada com a regulação e possivelmente com a detoxificação de metais. Os níveis de GSH variaram de acordo com cada tipo de metal, após exposição subletal de trutas (*Oncorhynchus mykiss*) a cádmio e zinco e a uma combinação de ambos por um período de 14 e 28 dias. Após 14 dias houve um leve aumento na GSH em todos os tratamentos. Porém, após 28 dias, apenas os animais expostos à combinação de Zn e Cd ($10 \mu\text{g Cd.L}^{-1}$ com $1000 \mu\text{g Zn.L}^{-1}$) apresentaram significativa elevação no conteúdo de GSH em relação ao grupo controle. Houve acumulação de Cd, embora não tenha ocorrido acumulação de Zn nos tecidos (LANGE; AUSSEIL; SEGNER, 2000).

Paris-Palacios; Biagianti-Risbourg e Vernet (2000) também verificaram um aumento nas defesas antioxidantes hepáticas, tanto no conteúdo de GSH quanto no da CAT, em peixes (*Danio rerio*) expostos por 14 dias a concentrações subletais de cobre na forma de CuSO_4 (40 e $140 \mu\text{g Cu.L}^{-1}$). Esta substância, que tem atividade antifúngica, é freqüentemente utilizada no cultivo de algodão e, juntamente com o cobre, derivado de corantes metálicos; podem ser encontrados em efluentes têxteis (BASTIAN; SANTOS; FERRARI, 2001; ZOLLINGER, 1991).

Benassi (2004) também verificou um aumento da atividade da CAT em peixes (*Oreochromis niloticus*) expostos aos efluentes provenientes de mineração de carvão não remediados, em relação ao grupo controle. Este autor sugere que a presença de compostos tóxicos no efluente de carvão não remediado provavelmente favoreceu a formação de peróxido de hidrogênio, potencializando a produção do radical hidroxil via reação de Haber-Weiss. Isto sugere que a elevação da atividade

da CAT também constitui um indício de uma forte geração de $O_2^{\bullet-}$ (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1998).

Resultados similares foram obtidos em estudo semi-estático conduzido em laboratório com fêmeas de *Danio rerio* que foram expostas a concentrações sub-letais de sulfato de cobre ($Cu SO_4$) (40 ± 5 e $140 \pm 30 \mu g Cu. L^{-1}$), durante 7 e 14 dias de exposição seguidos de 14 dias de recuperação, em água limpa, ao final dos quais os animais foram sacrificados. Em todos os peixes observou-se um aumento linear na atividade da CAT, proporcional ao aumento da concentração de cobre e ao tempo de exposição (PARIS-PALACIOS; BIAGIANTI-RISBOURG; VERNET; 2000). Este resultado era esperado, pois o cobre é conhecido como promotor de estresse oxidativo (SEGNER; BRAUNBECK, 1998).

Hermes-Lima e Storey (1996) consideram que a elevação da atividade da CAT representa um caráter adaptativo que está associado à prevenção do estresse oxidativo.

Curiosamente, na presente pesquisa os peixes expostos ao efluente QTS3 apresentaram diferença significativa em relação aos expostos ao efluente EB, nos quais aparentemente houve uma inibição da atividade desta enzima. A atividade da CAT para os peixes expostos ao efluente QTS3 não diferiu significativamente do grupo controle (Figura 19), indicando novamente que a remediação com quitosana reduziu a toxicidade do efluente, por ter retirado do efluente os agentes estressores.

Similarmente ao resultado obtido na presente pesquisa com peixes expostos ao efluente EB, em estudo efetuado por Bainy et al. (1996) houve uma inibição da atividade da CAT em tilápias (*Oreochromis niloticus*) expostas a um local poluído.

Corroborando os resultados do presente trabalho, Ribeiro et al. (2000) verificaram que o efluente têxtil tratado causou uma inibição da atividade da CAT de *Oreochromis niloticus* na primeira semana de tratamento, no entanto, verificou-se em seguida um aumento da atividade desta enzima que se manteve até o final (4ª semana) do tratamento.

Por outro lado, Jifa et al. (2005) verificaram que os níveis de CAT de peixes (*Lateolabrax japonicus*) foram mantidos significativamente altos em peixes expostos a surfactante após 6 dias de exposição, no entanto verificaram um decréscimo da enzima no tempo máximo de exposição (18 dias) mantendo-se acima dos níveis apresentados pelo grupo controle, o que indicou a toxicidade do surfactante dodecilbenzeno sulfonato de sódio, enquanto os animais expostos ao surfactante dodecil sulfato de sódio não apresentaram diferença significativa em relação ao grupo controle.

Hermes-Lima e Storey (1996) verificaram que a atividade da CAT na musculatura branca esquelética aumentou em rã-leopardo (*Rana pipiens*), quando foram expostas a anóxia; porém, sem haver variação nas demais enzimas. Segundo estes autores, esta elevação da atividade da CAT na musculatura representa um caráter adaptativo que está associado à prevenção da lipoperoxidação. Desta forma, a determinação da atividade da CAT, do nível de GSH e de TBARS fornecem informações que possibilitam avaliar o estado de estresse oxidativo em que os organismos se encontravam após a exposição a agentes estressores.

Os testes citogenéticos são provavelmente a forma mais sensível e eficiente de detecção dos efeitos de substâncias genotóxicas. Entre estes se destaca o teste cometa, no qual podem ser utilizados quaisquer tipos celulares que apresentem

núcleo, além de requer mínima quantidade de células sendo análises realizadas em nível de cada célula individualmente (SUMATHI et al., 2001).

O estresse oxidativo causado por EROs também representa uma fonte de dano ao DNA, pois devido à alta reatividade do radical hidroxil, este pode atuar sobre a molécula do DNA gerando diversos produtos, uma vez que este radical pode atacar os açúcares e também as bases do DNA em diferentes posições, como por exemplo, com uma 2'-desoxiguanosina nas posições 4, 5 ou 8 do anel purínico (BREEN; MURPHY, 1995).

Na presente pesquisa, além dos ensaios bioquímicos para a avaliação do estresse oxidativo foram realizados testes citogenéticos com *D. rerio* expostos aos efluentes têxteis remediados e não remediados, que foram posteriormente avaliados pelo teste cometa que confirmou os resultados de Lemos et al. (2005). Segundo estes autores a detecção precoce de efeitos adversos, como por exemplo, a ocorrência de dano ao DNA poderia ser possível através da realização de ensaios subletais.

Os resultados da presente pesquisa indicam que o efluente têxtil EB foi capaz de induzir maior dano ao DNA das células presentes no homogenato que incluía os tecidos: muscular, sanguíneo, hepático e os tecidos associados ao trato gastrointestinal. Por outro lado, nos peixes expostos ao efluente QTS3 houve uma fragmentação do DNA similar à que ocorre naturalmente, pois não apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo controle. Portanto, a remediação com quitosana foi eficiente na remoção de agentes clastogênicos que induziram dano ao DNA em peixes expostos ao efluente EB, conforme pode ser verificado na figura 20. Os nucleóides podem ser observados na tabela 5.

Similarmente Sumathi et al. (2001) consideraram que os efluentes têxteis contém agente(s) capaz(es) de induzir dano ao DNA de células do fígado e em eritrócitos de peixes. Estes autores verificaram a genotoxicidade de efluente têxtil através do teste cometa utilizando hepatócitos e eritrócitos de carpas (*Cyprinus carpio*) e verificaram que, em ambos os tipos celulares, o comprimento máximo da cauda dos cometas foi obtido no terceiro dia de tratamento, havendo um gradual decréscimo deste comprimento que continuou até o 28^o dia de tratamento. Também foi observada uma tendência de aumento das quebras no DNA de maneira diretamente proporcional ao aumento das concentrações do efluente têxtil testado.

A utilização de homogenato de *pool* de *D. rerio* na presente pesquisa forneceu resultados similares aos obtidos por Jarvis e Knowles (2003). Estes autores utilizaram organismos inteiros (embriões de *D. rerio*) no teste cometa, os quais podem fornecer melhores indicações de dano ao DNA do que se o ensaio fosse conduzido com poucos tipos celulares selecionados. Estes autores argumentam ainda que é mais provável que diferentes tipos celulares possam demonstrar mais adequadamente os danos provocados pela exposição do organismo.

Entre os metais, o alumínio destaca-se pelo seu efeito lesivo ao DNA, pois pode formar complexos com macromoléculas e evidências sugerem que o núcleo e a cromatina são freqüentemente sítios de ligação deste elemento na célula (CRAPPER-MCLACHLAN, 1986; KARLIK; EICHHORN; CRAPPER-MCLACHLAN, 1980). Parte do dano ao DNA verificado na presente pesquisa poderia ser atribuída ao alumínio detectado nos efluentes em estudo, principalmente no efluente ETE, no qual também foram encontradas as classes de maior dano ao DNA (Tabela 19).

Benassi (2004) também verificou a toxicidade de efluentes ricos em metais que, mesmo em uma diluição de 10 %, levaram à indução de dano ao DNA de peixes (*Oreochromis niloticus*) expostos aos mesmos.

Lemos et al. (2005) com o objetivo de validar o teste cometa como biomarcador de potencial genotóxico de substâncias indutoras de fragmentação do DNA, utilizaram tilápias (*Tilapia rendalli*) expostas a águas de lago contaminado com efluentes industriais e com despejos domésticos. Os autores concluíram que, o teste cometa realizado com sangue periférico desta espécie é um bom biomarcador, de acordo com os critérios estabelecidos por van der Oost, Beyer e Vermeulen (2003).

No presente trabalho, além do dano ao DNA avaliado pelo teste cometa, também foi avaliada a genotoxicidade medindo-se a frequência de micronúcleos, que foi maior nos peixes expostos ao efluente EB, como esperado, em função do potencial genotóxico associados aos metais (FAROON et al., 2004) e aos azo corantes (TSUDA et al., 2000). Já a remediação com quitosana foi eficiente na remoção da genotoxicidade do efluente QTS3, pois os animais expostos a este efluente apresentaram níveis similares de frequência de micronúcleos aos do grupo controle, conforme pode ser observado na figura 21.

Similarmente, o potencial genotóxico de efluentes de uma indústria têxtil foi demonstrado através do aumento da frequência de micronúcleos em eritrócitos do sangue periférico de *Oreochromis niloticus* expostos por 3, 6 e 9 dias às diferentes concentrações de efluente têxtil (ÇAVAS; ERGENE-GÖZÜKARA, 2003).

Curiosamente, não foram encontradas diferenças significativas entre as frequências de micronúcleos de peixes da espécie *Microtus pennsylvanicus*

coletados em sítio referência daqueles coletados em rios contaminados com pesticidas organoclorados e metais, como mercúrio, cádmio e chumbo. Aparentemente, os animais não acumularam danos ao DNA suficientes para resultar na formação de micronúcleos em eritrócitos acima dos níveis basais. Desta forma, embora tenham apresentado danos primários ao DNA verificados através do teste cometa, não apresentaram danos aos cromossomos (KNOPPER et al., 2005).

Embora tenham encontrado danos significativos ao DNA de eritrócitos de carpas (*Cyprinus carpio*) em apenas 3 dias de tratamento, Sumathi et al. (2001) não verificaram diferenças significativas nas freqüências de micronúcleos entre os animais expostos, quando comparadas ao controle negativo.

Segundo alguns autores, os metais, mesmo em baixas concentrações podem atuar sinergisticamente ou aditivamente quando em conjunto, pois estes atuam induzindo a genotoxicidade através de ligações com a estrutura de DNA e/ou de proteínas e através da geração de EROs (CHANDRA et al., 2005).

Em resumo, com base nos resultados obtidos de remoção de cor do efluente têxtil, no presente trabalho, verificou-se uma equivalência entre a remediação com quitosana (QTS3) e a remediação por processos convencionais efetuados pela empresa têxtil em estudo (ETE). Em ambas as remediações o pH manteve-se próximo da neutralidade. Porém, a condutividade do efluente ETE foi o dobro da apresentada pelo QTS3. No entanto, este efluente apresentou dureza um pouco maior do que o ETE. Por outro lado, a remediação com quitosana foi mais eficiente na remoção dos metais e, conseqüentemente, na redução da toxicidade. O efluente QTS3 não causou toxicidade aguda às bactérias bioluminescentes (*V. fischeri*) e aos microcrustáceos (*Artemia* sp e *D. magna*), enquanto o efluente ETE causou

toxicidade apenas à *D. magna*. O efluente QTS3 causou menor inibição de crescimento de raiz de bulbos de cebola (*A. cepa*), ao passo que a exposição dos bulbos ao efluente ETE causou forte inibição no crescimento das raízes, sendo esta maior do que aquela observada com o EB. A remediação com quitosana levou também a uma redução de toxicidade do efluente QTS3, verificada através dos biomarcadores de estresse oxidativo nos peixes que apresentaram menores níveis de lipoperoxidação determinada através de TBARS, enquanto os animais expostos ao ETE apresentaram valores maiores. Igualmente com relação à GSH, os animais expostos ao efluente remediado com QTS3 não apresentaram diferença significativa em relação ao grupo controle, enquanto os peixes expostos ao ETE apresentaram maiores níveis de GSH. Com relação à CAT, novamente os peixes expostos ao QTS3 não apresentaram diferença quanto ao grupo controle, enquanto os expostos ao ETE apresentaram comparativamente uma diminuição da atividade desta enzima.

Da mesma forma, a remediação com quitosana levou a uma redução da genotoxicidade, verificando-se menor dano ao DNA e menor frequência de micronúcleos, comparativamente aos peixes expostos ao efluente ETE, que apresentaram valores maiores para ambos.

Na indústria têxtil em estudo, apesar do tratamento convencional apresentar eficiência na descoloração do efluente, a toxicidade residual verificada no mesmo sugere que devem ser empregados compostos para a descoloração que apresentam toxicidade, que também poderia ser atribuída aos metais, corantes e surfactantes presentes no efluente têxtil.

6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que:

- A remediação realizada com quitosana na forma pulverizada apresentou maior eficácia na remoção de cor do efluente têxtil, quando comparada com as formas de microesferas e solução de quitosana em ácido acético. Entretanto, a remoção de cor obtida através da remediação através de tratamento microbiológico e físico-químico convencional (96 %), foi mais efetiva do que aquela obtida pela quitosana pulverizada (80 %).
- Na indústria têxtil em estudo, apesar do tratamento convencional apresentar eficiência na descoloração do efluente, foi verificada uma toxicidade residual, provavelmente devida às substâncias utilizadas na descoloração do efluente, bem como aos metais, corantes e surfactantes presentes no efluente.
- A remediação com quitosana promoveu a diminuição de todos os metais encontrados originalmente no efluente não remediado (EB), enquanto que na remediação realizada pela empresa (ETE) houve aumento de alguns metais, entre os quais o alumínio.
- O efluente remediado com quitosana na forma pulverizada (QTS3) e o efluente ETE não apresentaram toxicidade aguda para bactérias e para microcrustáceos (*Artemia* sp).
- A remediação com quitosana pulverizada apresentou menor toxicidade aguda para *D. magna* quando comparada ao tratamento convencional (ETE).
- De maneira geral, os bioindicadores utilizados (*Vibrio fischeri*, *Artemia* sp, *D. magna* e *D. rerio*) foram eficazes para caracterizar a toxicidade dos efluentes avaliados antes e após a remediação.

- Relativamente ao bioindicador *A. cepa*, a inibição no desenvolvimento de raízes de bulbos foi mais sensível, comparativamente à inibição da germinação de sementes e do crescimento de plântulas.
- De maneira geral, os biomarcadores de estresse oxidativo e de defesas antioxidantes utilizados (TBARS, GSH e CAT), também foram eficazes para caracterizar a toxicidade dos efluentes avaliados.
- Os biomarcadores de genotoxicidade (teste cometa e de micronúcleos) demonstraram, igualmente, que ambos são instrumentos eficientes para avaliar a toxicidade dos efluentes remediados (ETE e QTS3) e não remediado (EB).
- O uso integrado de diferentes biomarcadores demonstrou resultados convergentes, confirmando a adequação de sua utilização para o diagnóstico da qualidade de ambientes aquáticos.
- Finalmente, diante de todos os aspectos avaliados, pode-se concluir que a quitosana utilizada na forma pulverizada mostrou-se uma alternativa bastante promissora e eficiente no processo de remediação de efluentes têxteis. Portanto, a quitosana ao promover a remoção de cor, de metais e, provavelmente, de outros xenobióticos presentes no efluente remediado, determinou, conseqüentemente, a redução da toxicidade dos mesmos.

7 PERSPECTIVAS

- Aplicar o teste cometa e de micronúcleos em raízes de cebolas expostas aos diferentes efluentes visando avaliar o dano ao DNA, uma vez que este organismo mostrou-se sensível ao teste de toxicidade.
- Efetuar a avaliação da oxidação das proteínas nos peixes durante o estresse oxidativo por meio da carbonilação de proteínas, uma vez que estas são passíveis de sofrer oxidação, durante uma situação de estresse como a verificada nos experimentos realizados.
- Efetuar exposição crônica (30, 60 ou 90 dias) dos peixes aos efluentes, através de processo semi-estático com aeração, para verificar a ocorrência de perda do processo adaptativo às injúrias causadas pelas substâncias tóxicas presentes nos efluentes.
- Verificar nos efluentes a presença de compostos fenólicos e de outros que apresentam toxicidade para organismos aquáticos.
- Efetuar a quantificação de amins aromáticas nos efluentes.
- Realizar ensaios para avaliação das possibilidades de recuperação e reutilização da quitosana, em termos de sua aplicação e viabilidade econômica.
- Avaliar a biodegradabilidade da quitosana complexada com os corantes.

REFERÊNCIAS

- ABADIN, H. et al. **Draft Toxicological Profile for Lead**. U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 2005. Disponível em: <<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp13.pdf>>. Acesso em: 10 fev. 2006.
- ADAMS, S. M. et al. The use of bioindicators for assessing the effects of pollutant stress on fish. **Marine Environmental Research**, v. 8, p. 459-464, 1989.
- AEBI, H. Catalase *in Vitro*. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121-126, 1984.
- AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (ATSDR). **Toxicological profile for Thorium**. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. U. S. Environmental Protection Agency. 1990. Disponível em: <<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp147.pdf>>. Acesso em: 10 fev. 2006.
- AHLSTRÖM, L.; ESKILSSON, C. S.; BJÖRKLUND, E. Determination of banned azo dyes in consumer goods. **Trends in Analytical Chemistry**, v.24, n.1, p. 49-56, 2005.
- AHN, S. J. et al. Aluminium-induced growth inhibition is associated with impaired efflux and influx of H⁺ across the plasma membrane in root apices of squash (*Cucurbita pepo*). **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 376, p. 1959-1966, 2002.
- ALMEIDA, J. A. et al. The use of the oxidative stress responses as biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to *in vivo* cadmium contamination. **Environment International**, v. 27, n. 8, p. 673-679, 2002.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 20 ed. Washington, DC, USA: American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA), Water Environment Federation (WEF), 1998.
- ANGUIANO, L.; MONTAGNA, C.; PÉCHEN DE D'ANGELO, A. M. Rol del glutatión en la tolerancia a metilazinfos. In: HERKOVITZ, J. (ed.) **Toxicología y Química Ambiental. Contribuciones para un Desarrollo Sustentable**. Buenos Aires, Argentina. SETAC - LA, p.182 -184, 2003.
- ARAMBASIC, M. B.; BJELIC, S.; SUBAKOV, G. Acute toxicity of heavy metals (copper, lead, zinc), phenol and sodium on *Allium cepa* L., *Lepidium sativum* L. and *Daphnia magna* St.: comparative investigation and the practical applications. **Water Research**, v. 29, n. 2, p. 497-503, 1995.

ASCHNER, M.; LUKEY, B.; TREMBLAY, A. The Manganese Health Research Program (MHRP): Status report and future research needs and directions. **NeuroToxicology**, (*in press*).

ASPLAND, J. R. (a) Chapter 5: Reactive dyes and their application. **Textile Chemist and Colorist**, v. 24, n. 5, p. 31- 36, 1992.

_____.(b) Chapter 5/Part 2: Practical application of reactive dyes. **Textile Chemist and Colorist**, v. 24, n. 6, p. 35- 40, 1992.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA QUÍMICA (ABIQUM). **Corantes têxteis**. Disponível em: <<http://www.abiquim.org.br/corantes>>. Acesso em: 16 nov. 2005.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA TÊXTIL E DE CONFECÇÃO (ABIT). **Indústria Têxtil**. Disponível em: <<http://www.abit.org.br/abit/quemso.shtml>>. Acesso em: 20 set. 2004.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **NBR 5766 CB 12. Corantes orgânicos naturais e artificiais**. Rio de Janeiro: ABNT, 1974.

_____. **NBR 12713. Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia spp* (Cladocera, Crustácea)**. São Paulo: ABNT, 2003.

_____. **NBR 15088. Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com peixes**. São Paulo: ABNT, 2004.

BAE, J.; FREEMAN, H. S. Aquatic toxicity evaluation of new direct dyes to the *Daphnia magna*. **Dyes and Pigments**, (*in press*).

BAINY, A. C. D. et al. Oxidative stress in gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. **Aquatic Toxicology**, v. 34, p. 151-162, 1996.

BALAN, D. S. L. Biodegradação e toxicidade de efluentes têxteis. **Química Têxtil**, v. 22, n. 54, p. 26-31, 1999.

BALAN, D. S. L. Biodegradação e Toxicidade de Efluentes Têxteis. **Revista ABTT (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TÉCNICOS TÊXTEIS)**, v. 1; n. 1, p. 16-19, 2002.

BALAN, D. S. L.; MONTEIRO, R. T .R. Decoloration of textile índigo dye by lignolytic fungi. **Journal of Biotechnology**, v.89, p. 141-145, 2001.

BANCO REGIONAL DE DESENVOLVIMENTO DO EXTREMO SUL (BRDE). **Carta de Conjuntura 1º Sem/2004**. Diretoria de Planejamento. Superintendência de Planejamento. Número 8, primeiro semestre 2004. Disponível em: <http://www.brde.com.br/estudos_e_pub/Carta%20Conjuntura%202004%201ºsem.pdf>. Acesso em: 11 nov. 2004.

BANCO REGIONAL DE DESENVOLVIMENTO DO EXTREMO SUL (BRDE). **Carta de Conjuntura 1º Sem/2005**. Diretoria de Planejamento. Superintendência de Planejamento. Número 9, primeiro semestre 2005. Disponível em: <http://www.brde.com.br/estudos_e_pub/Carta%20Conjuntura%202005%201ºsem.pdf>. Acesso em: 17 nov. 2005.

BANERJEE, S.; DASTIDAR, M.G. Use of jute processing wastes for treatment of wastewater contaminated with dye and other organics. **Bioresource Technology**, v.96, n. 17, p. 1919-1928, 2005.

BAPTISTA, I. E. **Avaliação da toxicidade de efluentes gerados em uma indústria têxtil catarinense**. 2001. 133 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Sanitária e Ambiental) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

BAPTISTA, I. E. et al. Avaliação da toxicidade aguda de efluentes de uma indústria têxtil utilizando *Daphnia magna*, *Poecilia reticulata* e *Vibrio fischeri* como bioindicadores. In: ESPINDOLA, E. L. G. et al. (editores). **Ecotoxicologia Perspectivas para o Século XXI**. São Carlos: RiMa, 2002. p. 365-377.

BARAHONA, M. V.; SÁNCHEZ-FORTÚN, S. Comparative sensitivity of three age classes of *A. salina* larvae to several phenolic compounds. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 56, p. 271-278, 1996.

_____. Toxicity of carbamates to the brine shrimp *Artemia salina* and the effect of atropine, BW284c51, iso-OMPA and 2-PAM on carbaryl toxicity. **Environmental Pollution**, v. 104, p. 469-476, 1999.

BASTIAN, E. Y. O.; SANTOS, M. S.; FERRARI, L. R. **Compilação de Técnicas de Prevenção à Poluição para a Indústria Têxtil**. 2 ed. São Paulo: CETESB, 2001. 42 p.

BENASSI, J. C. **O uso de bioindicadores e biomarcadores na avaliação do processo de remediação de efluente de lixiviação de carvão mineral utilizando microesferas de quitosana**. 2004. 102 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

BERTELLI, A. et al. Experimental comparative renal toxicity of lithium and rubidium. **Drugs under Experimental and Clinical Research**, v. 11, n. 4, p. 269-273, 1985.

BEUTLER, E.; DURON, O.; KELLY, B. M. Improved method for the determination of blood glutathione. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 61, p. 882-890, 1963.

BIRCH, N. J. Lithium. In: SEILER, H. G.; SIGEL, H.; SIGEL, S. (Eds.) **Handbook on the Toxicity of Inorganic Compounds**. New York: Marcel Dekker, 1988. p. 382-393.

BIRD, R. P.; DRAPER, A. H. Comparative studies on different methods of malondyaldehyde determination. **Methods in Enzymology**, v. 90, p. 105-110, 1984.

BODDU, V. M. et al. Removal of hexavalent chromium from wastewater using a new composite chitosan biosorbent. **Environmental Science and Technology**, v. 37, p. 4449-4456, 2003.

BOETTCHER, K. J.; RUBY, E. G. Depressed light emission by symbiotic *Vibrio fischeri* of the sepiolid squid, *Euprymna scolopes*. **Journal of Bacteriology**, v. 172, p. 3701-3706, 1990.

BRAILE, P. M.; CAVALCANTI, J. E. W. A. **Manual de tratamento de águas residuárias industriais**. São Paulo: CETESB, 1993. 15 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNDA, DNDV, CLAV, 1992. 365 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde (FUNASA). **Portaria nº 1.469/2000, de 29 de dezembro de 2000: aprova o controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade**. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2001. 32 p.

BREEN, A. P.; MURPHY, J. A. Reactions of oxyl radicals with DNA. **Free Radical Biology and Medicine**, v.18, n. 6, p. 1033-1077, 1995.

BROWN, D.; HAMBURGUER, B. The degradation of dye stuffs. Part III. Investigations of their ultimate degradability. **Chemosphere**, v. 16, n. 7, p. 1539-1553, 1987.

BROWN, D.; LABOUREUR, P. The aerobic biodegradability of primary aromatic amines. **Chemosphere**, v. 12, n. 3, p. 405-414, 1983.

BUENO, A. M. S. Biomonitoramento citogenético *in situ*: um instrumento indicador de genotoxicidade ambiental. **Biotemas**, v. 13, p. 137-158, 2000.

BURKINSHAW, S. M.; JARVIS, A. N. The use of Chitosan in the Dyeing of Full Chrome Leather with reactives dyes. **Dyes and Pigments**, v. 31, n. 1, p. 35-52, 1996.

ÇAVAS, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. Genotoxicity evaluation of metronidazole using the piscine micronucleus test by acridine orange fluorescent staining. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 19, p. 107-111, 2005.

_____. Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) as cyto-genotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environment**, v. 538, p. 81-91, 2003.

- CHANDRA, S. et al. Comparative biomonitoring of leachates from hazardous solid waste of two industries using *Allium* test. **Science of Total Environment**, v. 347, p. 46-52, 2005.
- CHANDRA, S.; GUPTA, S. K. Genotoxicity of leachates of tannery solid waste in root meristem cells of *Allium cepa*. **Journal of Ecophysiology Occupational Health**, v. 2, p. 225-234, 2002.
- CHAO, A. et al. Enzymatic grafting of carboxyl groups on to chitosan to confer on chitosan the property of a cationic dye adsorbent. **Bioresource Technology**, v. 91, p. 157-162, 2004.
- CHATTERJEE, S.; BHATTACARYA, S. Detoxification pollutants by the glutathione-S-transferase system in the liver of *Anabas testudineus* (Bloch). **Toxicology Letters**, v. 22, p. 187-193, 1984.
- CHENG, W. P. et al. Using Chitosan as an Coagulant in Recovery of Organic Matters from the Mash and Lauter Wastewater of Brewery. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 13, n. 4, p. 383-388, 2005.
- CHEN, L.; CHEN, D.; WU, C. A. New Approach for the Flocculation Mechanism of Chitosan. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 11, n. 3, p. 87-92, 2003.
- CHIOU, M.S.; HO, P.Y.; LI, H. Y. Adsorption of anionic dyes in acid solutions using chemically cross-linked chitosan beads. **Dyes and Pigments**, v. 60, p. 69-84, 2004.
- CHIOU, M.S.; LI, H. Y. Equilibrium and kinetic modeling of adsorption of reactive dye on cross-linked chitosan beads. **Journal of Hazardous Materials B**, v. 93, n. 2, p. 248-263, 2002.
- COLLINS, A. R.; AI-GUO, M.; DUTHIE, S. J. The kinetics of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidized pyrimidines) in human cells. **Mutation Research**, v. 336, p. 69-77, 1995.
- CONNELLY, A.; SMYTH, W. F.; MACMULLAN, G. Metabolism of the phthalocyanine textile dye remazol turquoise blue by *Phanerochaete chrysosporium*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 179, n. 2, p. 333-337, 1999.
- CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (CONAMA). **Resolução nº 020, de 18 de junho de 1986. 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.** 1986. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res86/res2086.html>>. Acesso em: 10 nov. 2005.
- _____. **Resolução nº 237, de 19 de dezembro de 1997. Dispõe sobre as atividades ou empreendimentos sujeitos ao Licenciamento Ambiental.** 1997.

Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res97/res23797.html>>. Acesso em: 16 nov. 2005.

_____. **Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. 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.** 2005. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>>. Acesso em: 10 nov. 2005.

COULIBALY, L.; GOURENE, G.; AGATHOS, N. S. Utilization of fungi for biotreatment of raw wastewaters. **African Journal of Biotechnology**, v. 2, n. 12, p. 620-630, 2003.

CRAPPER-MCLACHLAN, D. R. Aluminum and Alzheimer's disease. **Neurobiology and Aging**, v. 7, p. 525-533, 1986.

DEMIRAK, A. et al. Heavy metals in water, sediment and tissues of *Leuciscus cephalus* from a stream in southwestern Turkey. **Chemosphere**, (*in press*).

DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG (DIN). **DIN 38412-34 Testverfahren mit Wasserorganismen (Gruppe L). Bestimmung der Hemmwirkung von Abwasser auf die Lichtemission von *Photobacterium phosphoreum*.**Berlin: DIN, 1993.

DEVENTER, K. Detection of Genotoxic Effects on Cells of Liver and Gills of *B. rerio* by Means of Single Cell Gel Electrophoresis. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 56, p. 911-918, 1996.

DIEKMANN, M. et al. On the relevance of genotoxicity for fish populations II: genotoxic effects in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to 4-nitroquinoline-1-oxide in a complete life-cycle test. **Aquatic Toxicology**, v. 68, p. 27-37, 2004.

DI GIULIO, R.T. et al. Biochemical mechanisms: metabolism, adaptation, and toxicity. In: RAND, G. M. (ed.) **Fundamentals of Aquatic Toxicology Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment**. 2 ed. NY: Taylor & Francis, 1995. p. 523-560.

DOS SANTOS, A. B. et al. The transformation and toxicity of anthraquinone dyes during thermophilic (55 °C) and mesophilic (30 °C) anaerobic treatments. **Journal of Biotechnology**, v. 115, p. 345-353, 2005.

DOS SANTOS, A. B. **Reductive Decolourisation of Dyes by Thermophilic Anaerobic Granular Sludge**. 2005. 176 f. Thesis (PhD) - University Wageningen, The Netherlands, 2005.

EIDEN, C. A.; JEWELL, C. A.; WIGHTMAN, J. P. Interaction of Lead and Chromium with Chitin and Chitosan. **Journal of Applied Polymers Science**, v. 25, p. 1587-1599, 1980.

EL-NAGGAR, M. A.; EL-AASAR, S. A.; BARAKAT, K. I. Bioremediation of crystal violet using air bubble bioreactor packed with *Pseudomonas aeruginosa*. **Water Research**, v. 38, p. 4313-4322, 2004.

ETTINGER, A. S. et al. Levels of Lead in Breast Milk and their relation to maternal blood and bone lead levels at one month postpartum. **Environmental Health Perspectives**, v. 112, n. 8, p. 926-931, 2004.

FAROON, O. M. et al. **Toxicological Profile for Cobalt**. U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 2004. Disponível em: <<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp33.pdf>>. Acesso em: 10 fev. 2006.

FÁVERE, V. T. **Adsorção dos íons Cu(II), Cd(II), Ni(II), Pb(II) e Zn(II) pelo biopolímero quitina, quitosana e pelas quitosanas modificadas**. 1994. 153 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

FÁVERE, V. T. et al. Use of chitosan microsferes as remedial material for acidity and iron (III) contents of coal mining wastewaters. **Environmental Technology**, v. 25, p. 861-866, 2004.

FIELD, J. A. et al. Enhanced degradation of aromatic pollutant in coculture of anaerobic and aerobic bacterial consortia. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 67, p. 47-77, 1995.

FISH BASE. **Danio rerio**. California Academy of Sciences. 2005. Disponível em: <<http://www.fishbase.org/Summary/SpeciesSummary.php?id=4653>>. Acesso em: 20 dez. 2005.

FISKESJO, G. The *Allium* test - an alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions. **Mutation Research**, v. 197, p. 243-260, 1988.

_____. The *Allium* test in wastewater monitoring. **Environmental Toxicology and Water Quality**, v. 8, p. 291-298, 1993.

FORTÚN, S. S. et al. Acute sensitivity of three age classes of *Artemia salina* larvae to seven chlorinated solvents. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 59, p. 445-451, 1997.

FRITZ, J. S., SCHENK JUNIOR, G. H. **Quantitative Analytical Chemistry**. 2 ed. Boston, USA: Allyn & Bacon, 1969. p. 228-232.

FUNDAÇÃO DO MEIO AMBIENTE (FATMA). **Portaria Intersectorial nº 01/92 que aprova a Listagem das Atividades Consideradas Potencialmente Causadoras de Degradação Ambiental**. 1992. Disponível em: <http://www.fatma.sc.gov.br/temas/tema3/PORTARIA_01_1992.htm>. Acesso em: 14 nov. 2004.

_____. **Portaria Nº 017 de 18/04/2002. Estabelece os Limites Máximos de Toxicidade Aguda para efluentes de diferentes origens e dá outras providências.** 2002. Disponível em: <http://www.fatma.sc.gov.br/temas/tema3/PORTARIA_17_2002.htm>. Acesso em: 14 nov. 2004.

GALLAGHER, E. P.; DI GIULIO, R. T. A comparasion of glutathione-dependent enzymes in liver, gills and posterior kidney of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 102, p. 543-547, 1992.

GALLEGO, S. M.; BENAVIDES, M. P.; TOMARO, M. L. Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for oxidative stress. **Plant Science**, v. 121, n. 2, p. 151-159, 1996.

GAVRILESCU, M.; CHISTI, Y. Biotechnology - a sustainable alternative for chemical industry. **Biotechnology Advances**, v. 23, p. 471-499, 2005.

GIRARDI, E.; VALLDEPERAS, J.; LIZ, M. Novos corantes dispersos biodegradáveis. **Química Têxtil**, v. 22, n. 55, p. 34-45, 1999.

GOMES, L. A. **O Cultivo de crustáceos e moluscos**. São Paulo: Nobel, 1986. 226 p.

GONTIJO, A. M. M. C.; TICE, R. Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ed. ULBRA, 2003. p. 247-279.

GRAFF, L. et al. Toxicity of chemicals to microalgae in river and in standard waters. **Environmental and Toxicological Chemistry**, v. 22, p. 1368-1379, 2003.

GRANT, W. F. Chromosome aberrations assays in *Allium*. A report of the US Environmental Agency Gene-Tox Program. **Mutation Research**, v. 99, p. 273-291, 1982.

GUARATINI, C. C. I.; ZANONI, M. V. Corantes Têxteis. **Química Nova**, v. 23, n. 1, p. 71-78, 2000.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3rd ed. Oxford: Claredon Press, 1998. 545 p.

HAMILTON, M. A.; RUSSO, R. C.; THURSTON, R. V. Trimmed Sperman-Karber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity assays. **Environmental Science and Tecnology**, v. 11, n.7, p. 714-719, 1977.

HAO, O. J.; KIM, H.; CHANG, P. C. Decolorization of wastewater. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 30, p. 449-505, 2000.

HAYASHI, M. et al. Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms. **Mutation Research**, v. 399, p. 125-133, 1998.

HAYASHI, M. et al. *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. **Mutation Research**, v. 312, p. 293-304, 1994.

HAYASHI, M.; SOFUNI, T.; ISHIDATE JUNIOR, M. An application of acridine orange fluorescent staining to the micronucleus test. **Mutation Research**, v. 120, p. 241-247, 1983.

HERMES-LIMA, M.; STOREY, K. B. Relationship between anoxia exposure and antioxidant status in the frog *Rana pipiens*. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 271, n. 4, p. R918-R925, 1996.

HERMES-LIMA, M.; WILLMORE, W. G.; STOREY, K. B. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe (III) xylenol orange complex formation. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 19, n. 3, p. 271-280, 1995.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Lista de atividades industriais / comerciais potencialmente contaminadoras do solo e águas subterrâneas. Projeto CETESB-GTZ**. 1999. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/areas_contaminadas/anexos/download/3101.pdf> . Acesso em: 15 jul. 2004.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS (IBAMA). **Relação das Atividades Potencialmente Poluidoras e/ou Utilizadoras de Recursos Ambientais**. 2000. Disponível em: <<http://www.lbamapr.hpg.lg.com.br/ractfapp.htm>>. Acesso em: 15 mar. 2003.

INTEGRATED TAXONOMIC INFORMATION SYSTEM NORTH AMERICA (ITIS). **Brachidanio rerio**. 2005. Disponível em: <http://www.cbif.gc.ca/pls/itisca/taxastep?king=every&p_action=containing%taxa=Brachidanio%20rerio.htm>. Acesso em: 10 abr. 2005.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lead Salts. Summary of Data Reported and Evaluation**. World Health Organization. Lyon, France, v.1, p. 40, 1972. Disponível em: <<http://www.cie.iarc.fr/htdocs/monographs/vol01/lead.html>>. Acesso em: 12 fev. 2006.

_____. **IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Some Flame Retardants and Textile Chemicals, and Exposures in the Textile Manufacturing Industry. Summary of Data Reported and Evaluation**. World Health Organization. Lyon, France, v. 48, p. 215, 1990. Disponível em: <<http://www-cie.iarc.fr/htdocs/monographs/vol48/48-13>>. Acesso em: 12 fev. 2006.

_____. **IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Some Metals and Metallic Compounds. Summary of Data Reported and Evaluation. Lead and Lead Compounds**. World Health Organization. Lyon, France, v. 23, p. 325, 1980. Disponível em:

<<http://www-cie.iarc.fr/htdocs/monographs/vol23/lead.html>>. Acesso em: 12 fev. 2006.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). **Water Quality: Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish (*Brachidanio rerio* Hamilton-Buchanan [Teleostei, Cyprinidae]). ISO 7346 Part 2: Semistatic method.** Geneve: International Organization for Standardization. 1996.

_____. **Water quality: Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (luminescent bacteria test). Part 1: Method using freshly prepared bacteria. ISO/DIS 11348-1.** Geneve: International Organization for Standardization, 1998.

ISIDORI, M. et al. Toxicity on crustaceans and endocrine disrupting activity on *Saccharomyces cerevisiae* of eight alkylphenols. **Chemosphere**, (*in press*).

IŞIK; M.; SPONZA, D. T. Aromatic Amine Degradation in an UASB/CSTR Sequential System Treating Congo Red Dye. **Journal of Environmental Science and Health Part A**, v. 38, n. 10, p. 2301-2315, 2003.

_____. Monitoring of toxicity and intermediates of C.I. Direct Black 38 azo dye through decolorization in an anaerobic/aerobic sequential reactor system. **Journal of Hazardous Materials**, v. 114, n. 1-3, p. 29-39, 2004.

JANSSON-CHARRIER, M. et al. Vanadium (IV) Sorption by Chitosan: Kinetics and Equilibrium. **Water Research**, v. 30, p. 465-475, 1996.

JARVIS, R. B.; KNOWLES, J. F. DNA damage in zebrafish larvae induced by exposure to low-dose rate gama-radiation: detection by the alkaline comet assay. **Mutation Research**, v. 541, p. 63-69, 2003.

JEFFERIES, H. et al. Glutathione. **ANZ Journal of Surgery**, v. 73, n. 7, p. 517-522, 2003.

JIFA, W. et al. Comparative researches on effects of sodium dodecylbenzene sulfonate and sodium dodecyl sulfate upon *Lateolabrax japonicus* biomarker system. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 20, n. 3, p. 465-470, 2005.

JUANG, R.; SHAO, H. Effect of pH on Competitive Adsorption of Cu(II), Ni(II), and Zn(II) from Water onto Chitosan Beads. **Adsorption**, v. 8, p. 71-78, 2002.

KARAPINAR, I. K. et al. Effect of environmental conditions on biological decolorization of textile dyestuff by *C. versicolor*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 381-387, 2000.

KARLIK, S. J.; EICHHORN, G. L.; CRAPPER-MCLACHLAN, D. R. Molecular interactions of aluminum with DNA. **Neurotoxicology**, v.1, p. 83-88, 1980.

KEITH, S. et al. **Toxicological Profile for Aluminum**. ATSDR – Agency for Toxic Substances and Disease Registry. U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service. 1999. Disponível em: <<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp22.html>>. Acesso em: 16 jan. 2006.

KIMURA, I. Y. et al. Adequacy of isotherm adsorption of black 5 reactive dye for crosslinked chitosan microspheres. **Acta Scientiarum**, v. 23, n. 6, p. 1313-1317, 2001.

KIMURA, I. Y. et al. Efeito do pH e do tempo de contato na adsorção de corantes reativos por microesferas de quitosana. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, n. 3, p. 51-57, 1999.

KIMURA, I. Y. **Remoção de corantes reativos contendo grupos vinilsulfona e triazina por adsorção e coagulação/floculação com quitosana**. 2001. 200 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

KISNIERIENĖ, V.; SAKALAUSKAS, V. Al^{3+} induced membrane potential changes in *Nitellopsis obtusa* cells. **BIOLOGIJA**, n.1, p.31-34, 2005.

KNIE; J. L. W.; LOPES, E. W. B. **Testes Ecotoxicológicos**. Florianópolis: FATMA, 2004. 289 p.

KNOPPER, L. D. et al. Use of Comet and Micronucleous Assays to Measure Genotoxicity in Meadow Voles (*Microtus pennsylvanicus*) Living in Golf Course Ecosystems Exposed to Pesticides. **Ecotoxicology**, v. 14, p. 323-335, 2005.

KNUT, K. R. **Gestão Ambiental: Um Estudo de Caso para o Setor Têxtil – S. C.** 2001. 200 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

KONISHI, T. et al. A new class of glutathione S-transferase from the hepatopancreas of the red sea bream *Pagrus major*. **Biochemistry Journal**, v. 388, p. 299-307, 2005.

KÜLTZ, D. Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. **Annual Review of Physiology**, v. 67, p. 225-257, 2005.

KUMAR, K. et al. Decolorisation, biodegradation and detoxification of benzidine based azo dye. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 407- 413, 2006.

KUMAR, M. N. V. R. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and Functional Polymers**, v. 46, p. 1-27, 2000.

KUNZ, A. et al. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 78-82, 2002.

LANGE, A.; AUSSEIL, O.; SEGNER, H. Alterations of tissue thiol levels of rainbow trout exposed to sub-lethal metal concentrations. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v.126, p. S 87, 2000.

LAUS, R. et al. Microsfemas de quitosana reticuladas com tripolifosfato utilizadas para remoção da acidez, ferro (III) e manganês (II) de águas contaminadas pela mineração de carvão. **Química Nova**, v. 29, n. 1; p. 34-39, 2006.

LEDAKOWICZ, S.; SOLECKA, M.; ZYLLA, R. Biodegradation, decolourisation and detoxification of textile wastewater enhanced by advanced oxidation processes. **Journal of Biotechnology**, v. 89, p. 175-184, 2001.

LEMOS, N. G. et al. Evaluation of environmental waters using the comet assay in *Tilapia rendalli*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 19, p. 197-201, 2005.

LÉONARD, A.; HANTSON, P.; GERBER, G. B. Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of lithium compounds. **Mutation Research / Reviews in Genetic Toxicology**, v. 339, n. 3, p. 131-137, 1995.

LIMA, P. L. et al. Time-Course Variations of DNA Damage and Biomarkers of Oxidative Stress in *Tilapia (Oreochromis niloticus)* Exposed to Effluents From a Swine Industry. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 50, n. 1, p. 23-30, 2006.

LIVINGSTONE, D. R. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. **Marine Pollution Bulletin**, v.42, p. 656-666, 2001.

MACGREGOR, J. T. et al. Guide-lines for the conduct of micronucleous assay in bone marrow erythrocytes. **Mutation Research**, v. 189, p. 103-112, 1987.

MEAGHER, E. A.; FITZGERALD, G. A. Indices of lipid peroxidation in vivo: Strengths and limitations. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p. 202-226, 2000.

MEINELT, T. et al. The toxicity of the antiparasitic mixture, FMC is changed by humic substances and calcium. **Aquaculture Research**, v. 32, n. 5, p. 405-410, 2001.

MELO FILHO, L. C. **Efeito da pré-ozonização na geração de lodo em processos de coagulação - floculação no tratamento de efluentes têxteis**. 1997. 122 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Sanitária e Ambiental) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

MERGLER, D. Neurotoxic Effects of Low Level Exposure to Manganese in Human populations. **Environmental Research Section A**, v. 80, n. 2, p. 99-102, 1999.

MERİÇ, S.; SELÇUK, H.; BELGIORNO, V. Acute toxicity removal in textile finishing wastewater by Fenton's oxidation, ozone and coagulation–foccculation processes. **Water Research**, v.39, p. 1147-1153, 2005.

MEYER, B. N. et al. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, v. 45, p. 31-34, 1982.

MONTEIH, D. K.; VANSTONE, J. Comparison of the microgel electrophoresis assay and other assays for genotoxicity in the detection of DNA damage. **Mutation Research**, v. 345, p. 97-103, 1995.

MUTTI, A. Biological monitoring in occupational and environmental toxicology. **Toxicology Letters**, v. 108, p. 77-89, 1999.

MUZZARELLI, R. A. A.; WECKX, M.; FILIPPINI, O. Removal of trace metals ions from industrial waters nuclear effluents and drinking water, with the aid of cross-linked *N*-carboxymethyl chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 11, p. 293-306, 1989.

NADIN, S. B.; VARGAS-ROIG, L. M.; CIOCCA, D. R. A Silver Staining Method for Single-cell Gel Assay. **The Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 49, n. 9, p. 1183-1186, 2001.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Biologic markers in pulmonary toxicology**. Washington, DC: National Academy Press, 1989. 179 p.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. COMMITTEE ON BIOLOGICAL MARKERS OF THE NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Biological markers in environmental health research. **Environmental Health Perspectives**, v. 74, p. 3-9, 1987.

NOGAWA, K. et al. A dose-response analysis of cadmium in the general environment with special reference to total cadmium intake limit. **Environmental Research**, v. 48, n. 1, p. 7-16, 1989.

NUNES-HALLDORSON, V. S.; DURAN, N. L. Bioluminescent bacteria: *lux* genes as environmental biosensors. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 91-96, 2003.

ODEIGAH, P. G. C.; OSANYIPEJU, A. O. Effluents and Ethyl Methane Sulfonate in *Clarias lazera*. **Food Chemistry and Toxicology**, v. 33, n. 6, p. 501-505, 1995.

OHKAWA, H. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, p. 351-358, 1979.

OH, S. W. et al. Detection of carcinogenic amines from dyestuffs or dyed substrates. **Dyes and pigments**, v. 33, n. 2, p. 119-135, 1997.

ONSOYEN, E.; SKAUGRUD, O. Metal recovery using chitosan. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 49, p. 395-404, 1990.

PARIS-PALACIOS, S.; BIAGIANTI-RISBOURG, S.; VERNET, G. Biochemical and (ultra)structural hepatic perturbations of *Brachydanio rerio* (Teleostei, Cyprinidae) exposed to two sublethal concentrations of copper sulfate. **Aquatic Toxicology**, v. 50, n. 1-2, p. 109-124, 2000.

PEARCE, C. I.; LLOYD, J. R.; GUTHRIE, J. T. The removal of colour from textile wastewater using whole bacterial cells: a review. **Dyes and Pigments**, v. 58, p. 179-196, 2003.

PEÑA S. et al. D. Role of glutathione in thiobencarb resistance in the European eel *Anguilla anguilla*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 46, n. 1, p. 51-56, 2000.

PENG, J.; JONES, G. L.; WATSON, K. Stress proteins as biomarkers of oxidative stress: effects of antioxidant supplements. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 28, p. 1598-1606, 2000.

PERSOONE, G. et al. (Eds.) **The Brine Shrimp *Artemia***. Wetteren, Belgium: Universa Press, 1980. 500 p.

PERUZZO, L. C. **Influência de agentes auxiliares na adsorção de corantes de efluentes da indústria têxtil em colunas de leito fixo**. 2003. 80 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

PIANA, Z.; TILLMANN, M. A. A.; SILVA, W. R. Avaliação do vigor de sementes de cebola pelo teste do estresse hídrico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.30, n. 6, p. 867-873, 1995.

PIELESZ, A. et al. Detection and Determination of Aromatic Amines as Products of Reductive Splitting from Selected Azo Dyes. **Ecotoxicology and Environmental Safety. Environmental Research, Section B**, v. 53, p. 42-47, 2002.

PINHEIRO, H. M.; TOURAUD, E.; THOMAS, O. Aromatic amines from azo dye reduction: status review with emphasis on direct UV spectrophotometric detection in textile industry wastewaters. **Dyes and Pigments**, v. 64, p. 121-139, 2004.

PIP, E. Cadmium, copper and lead in wild rice from central Canada. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 24, n. 2, p. 179-181, 1993.

RAYMOND, L.; MORIN, F. G.; MARCHESSAULT, R. H. Degree of deacetylation of chitosan using conductometric titration and solid-state NMR. **Carbohydrate Research**, v. 246, p. 331-336, 1993.

RHAZI, M. et al. Influence of the nature of the metal ions on the complexation with chitosan. Application to the treatment of liquid waste. **European Polymer Journal**, v. 38, p. 1523-1530, 2002.

RIBEIRO, L. et al. Estresse oxidativo em Tilápia (*Oreochromis niloticus*) exposta ao efluente de indústria têxtil. In: ESPINDOLA, E. L. G et al. (editores). **Ecotoxicologia Perspectivas para o Século XXI**. São Carlos: RiMa, 2000. p. 365- 377.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas, Rio Grande do Sul: Ed. ULBRA, 2003. 306 p.

RODO, A. B. **Avaliação do potencial fisiológico de sementes de cebola e sua relação com o desempenho das plantas em campo**. 2002. 123 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade de São Paulo, Piracicaba.

RONEY, N.; COLMAN, J. **Interaction profile for: Lead, manganese, zinc, and copper**. U.S. Department of Health and Human Services Public Health Service. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2004. 121 p.

SALEN, V. Corantes na Indústria Têxtil – Uma abordagem ecológica. **Química Têxtil**, v. 38, p. 6-15, 1995.

SANIN, L. B. B. A indústria têxtil e o meio ambiente. In: XIV CONGRESSO DA FLAQT, 14., 1997, Caracas. **Anais...** Caracas: Federação Latino Americana de Química Têxtil, 1997, p. 13-34.

SANTOS, N. E. S. **Utilização da análise de "filière" com a variável ambiental "efluentes líquidos e estações de tratamento" no estudo de comportamento das indústrias têxteis do vale do Itajaí – SC**. 1996. 102 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

SCHLENK, D. Necessity of defining biomarkers for use in ecological risk assessments. **Marine Pollution Bulletin**, v. 39, p. 48-53, 1999.

SEGNER, H.; BRAUNBECK, T. Cellular response profile to chemical stress. **Ecotoxicology**, v. 3, p. 521-569, 1998.

SERVIÇO NACIONAL DE APRENDIZAGEM INDUSTRIAL (SENAI); CENTRO DE TECNOLOGIA DA INDÚSTRIA QUÍMICA E TÊXTIL (CETIQT); DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR TECHNISCHE ZUSAMMENARBEIT (GTZ). **Introdução às Técnicas de Estamparia**. Projeto de Apoio Tecnológico à Modernização dos Departamentos de Confecção e Acabamentos Têxteis do SENAI. Apostila de curso, Rio de Janeiro: SENAI / CETIQT / GTZ, 1998. 35 p.

SILBERGELD, E. K. Neurochemical Approaches to Developing Biochemical Markers of Neurotoxicity: Review of Current Status and Evaluation of Future Prospects. **Environmental Research**, v. 63, n. 2, p. 274-286, 1993.

SILVA, A. C.; DEZOTTI, M.; SANT'ANNA JÚNIOR, G. L. Treatment and detoxification of a sanitary landfill leachate. **Chemosphere**, v. 55, p. 207-214, 2004.

SINGH, B. et al. Impact of lead pollution on the status of other trace metals in blood and alterations in hepatic functions. **Biology of Trace Elements Research**, v. 40, n. 1; p. 21-29, 1994.

SINGH, N. P. et al. A simple technique for quantitation of levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, p.184-191, 1988.

SINGH, N. P. **Comet Assay Forum. Definitions**. 2005. Disponível em: <<http://comet.itrcindia.org/defini1.gif>>. Acesso em: 10 dez. 2005.

SISINNO, C. L. S. et al. Toxicity Evaluation of a Municipal Dump Leachate Using Zebrafish Acute Tests. **Bulletin of Environmental and Contamination Toxicology**, v.64, n. 1, p. 107-113, 2000.

SMITH, B. **Identification and reduction of toxic pollutants in textile mill effluents**. Raleigh, North Carolina: College of Textiles. North Carolina State University, 1990. 107 p.

SMOLDERS, R.; BERVOETS, L.; BLUST, R. *In situ* and laboratory bioassays to evaluate the impact of effluent discharges on receiving aquatic ecosystems. **Environmental Pollution**, v.123, p. 231-243, 2004.

SNYDERWINE, B. G. et al. Highlights of the eighth international conference on carcinogenic / mutagenic N-substituted aryl compounds. **Mutation Research**, v. 506, p. 1-8, 2002.

SOCIETY OF DYERS AND COLOURISTS. **Colour Heritage Edition**. 2005. Disponível em: <<http://www.sdc.org.uk/publications/ci4intro.htm>>. Acesso em: 10 fev. 2006.

SORGELOOS, P. et al. **Manual para el cultivo y uso de Artemia en acuicultura**. Bélgica: Programa Cooperativo Gubernamental FAO - Itália, Universidad del Estado en Gent, Bélgica, Facultad de Agronomia, Centro de Referencia de Artemia. 1986. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/field/003/AB474S/AB474S07.htm>>. Acesso em: 10 fev. 2006.

SOTERO-SANTOS, R. B.; ROCHA, O.; POVINELLI, J. Evaluation of water treatment sludges toxicity using the *Daphnia* bioassay. **Water Research**, v. 39, p. 3909-3917, 2005.

SOUZA, C. R. L.; PERALTA-ZAMORA, P. Degradação de corantes reativos pelo sistema ferro metálico/peróxido de hidrogênio. **Química Nova**, v. 28, n. 2, p. 226-228, 2005.

SPINELLI, V. **A utilização do polieletrólito quitosana no tratamento de água**. 2001. 135 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Sanitária e Ambiental) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

SPONZA, D. T.; IŞIK, M. Toxicity and intermediates of C.I. direct Red 28 dye through sequential anaerobic/ aerobic treatment. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2735-2744, 2005.

STOHS, S. J.; BAGCHI, D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. **Free Radicals in Biology and Medicine**, v. 18, n. 2, p. 321-336, 1995.

STOLBERG, J. et al. Microspheres of chitosan/poly (vinylalcohol) incorporating tetrasulphonated copper (II) phthalocyanine: preparation and characterization. **Journal of Microencapsulation**, v. 16, p. 431-438, 1999.

SUMATHI, M. et al. Genotoxicity of Textile Dye Effluent on Fish (*Cyprinus carpio*) Measured Using the Comet Assay. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v 66, p. 407-414, 2001.

SUPAKA, N. et al. Microbial decolorization of reactive azo dyes in a sequential anaerobic/aerobic reactor system. **Chemistry Engineering Journal**, v. 99, p. 169-179, 2004.

TAHIR, S. S.; RAUF, N. Removal of a cationic dye from aqueous solutions by adsorption onto bentonite clay. **Chemosphere**, (*in press*).

TÍQUIA, S. M.; TAM, N. F. Y.; HODGKISS, I. J. Effects of Composting on Phytotoxicity of Spent Pig-Manure Sawdust Litter. **Environmental Pollution**, v. 93, p. 249-256, 1996.

TOFIL, N. M.; BENNER, K. W.; WINKLER, M. K. Fatal hypermagnesemia caused by an Epsom salt enema: a case illustration. (Case Report). **Southern Medical Journal**, v. 98, n. 2, p. 253-254, 2005.

TROTMAN, E. R. **Dyeing and chemical technology of textile fibres**. 6 ed. High Wycombe: C. Griffin, 1984. 587p.

TSUDA, S. et al. The comet assay in eight mouse organs: results with 24 azo Compounds. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 465, n. 1-2, p. 11-26, 2000.

TÜNAY, O. Color removal from textile wastewaters. **Water Science and Tecnology**, v. 34, n. 11, p. 9 -16, 1996.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). **Hazard Profiles for Selected Heavy Metals**. Washington, DC: Office of Pollution Prevention and Toxics, Health and Environmental Review Division, Environmental Effects Branch. 1991. Disponível em: <<http://www.epa.gov/oppt/newchemicals/tools/sarman.pdf>>. Acesso em: 30 dez. 2005.

USTINOV, M. Y. et al. Composition and properties of biodegradable materials. **Fibre Chemistry**, v. 36, n. 3, p. 189-192, 2004.

VALENTINI, A. et al. Processo alternativo para remoção de cobre (II) e níquel (II) de soluções aquosas utilizando cápsulas de quitosana – álcool polivinílico. **Química Nova**, v. 23, n.1, p. 12-15, 2000.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, p. 57-149, 2003.

VANDEVIVERE, P.C.; BIANCHI, R.; VERSTRAETE, W. Treatment and reuse of waste-water from the textile wetprocessing industry. **Journal of Chemistry, Technology and Biotechnology**, v. 72, p. 289-302, 1998.

VAN SCHÖLL, L. et al. Aluminium concentration versus the base cation to aluminium ratio as predictors for aluminium toxicity in *Pinus sylvestris* and *Picea abies* seedlings. **Forest Ecology and Management**, v. 195, n. 3, p. 301-309, 2004.

VARMA, A. J., DESHPANDE, S. V., KENNEDY, J. F. Metal complexation by chitosan and derivatives: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 55, p. 77-93, 2004.

VAZOLLÉR, R. F. **Microbiologia de Iodos Ativados**. São Paulo: CETESB, 1989. 23 p.

VILLELA, S. M. et al. Descoloração de corantes e efluente de uma indústria têxtil, em bioreatores utilizando Lacase, Lacase com HBT e caldo bruto de *Pleurotus ostreatus*. In: ENCONTRO DE QUÍMICA DA REGIÃO SUL, 13., 2005, Florianópolis. **Resumos...** Florianópolis: Sociedade Brasileira de Química - Sul, 2005.

WANG, C. et al. Toxicity evaluation of reactive dyestuffs, auxiliaries and selected effluents in textile finishing industry to luminescent bacteria *Vibrio fischeri*. **Chemosphere**, v. 46, p. 339-344, 2002.

WANG, W.; KETURI, P. H. Comparative seed germination tests using ten plant species for toxicity assessment of a metal engraving effluent sample. **Water, Air and Soil Pollution**, v. 52, p. 369-376, 1990.

WEBER, E. J.; WOLFE, N. L. Kinetic study of the reduction of aromatic azo compound in anaerobic sediment/water systems. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 6, p. 911-919, 1987.

WILHELM FILHO, D. et al. Influence of season and pollution on the antioxidant defenses of the cichlid fish acará (*Geophagus brasiliensis*). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, p. 719-726, 2001.

WILHELM FILHO, D. et al. The effect of pulp mill effluent on two fish species. In: Brazilian Symposium on the Chemistry of Lignins and Other Wood Components, 5., 1997, Curitiba, PR. **Proceedings...** Curitiba, 1997, p. 612-619.

WILHELM FILHO, D. Fish antioxidant defenses – a comparative approach. **Brazilian Journal of Medicine and Biological Research**, v. 29, p. 1735-1742, 1996.

WILHELM FILHO, D.; GIULIVI, C.; BOVERIS, A. Antioxidant defences in marine fish-I. Teleosts. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology and Toxicology**, v. 106, n. 2, p. 409-413, 1993.

WILLIAM MYRON KECK FOUNDATION. **Vibrio fischeri Genome Project**. 2002. Disponível em: <http://ergo.integratedgenomics.com/Genomes/VFI/vibrio_fischeri.html>. Acesso em: 10 jan. 2006.

WOLFF, D. B. **Estudo da tratabilidade de um efluente têxtil por biomassa fixa através de um reator de leito fluidizado trifásico aeróbio**. 1997. 92 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Sanitária e Ambiental) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

WU, F.; TSENG, R.; JUANG, R. Kinetic modeling of liquid-phase adsorption of reactive dyes and metal ions on chitosan. **Water Research**, v. 35, n. 3, p. 613-618, 2001.

ZANONI, M. V.; CARNEIRO, P. A. Corantes na indústria têxtil. **Ciência Hoje**, v. 29, p. 61-71, 2001.

ZHANG, J. F. et al. Responses of the antioxidant defenses of the Goldfish *Carassius auratus*, exposed to 2,4-dichlorophenol. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 19, p. 185-190, 2005.

ZHANG, K.; ZHOU, Q. Toxic effects of Al-based coagulants on *Brassica chinensis* and *Raphanus sativus* growing in acid and neutral conditions. **Environmental Toxicology**, v. 20, n. 2, p. 179-187, 2005.

ZHENG, Z. et al. Decolorization of polymeric dyes by a novel *Penicillium* isolate. **Process Biochemistry**, v. 34, p. 31-37, 1999.

ZOLLINGER, H. **Color chemistry: syntheses, properties and applications of organic dyes and pigments**. 2 ed. rev. Weinheim: VCH, 1991. 496 p.

ZONG, Z. et al. Characterization of chemical and solid state structures of acylated chitosans. **Polymer**, v. 41, p. 899-906, 2000.

ZWART, L. L. et al. Biomarkers of free radical damage: Applications in experimental animals and in humans. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p. 202-226, 1999.