

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CAMPUS CURITIBA
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE QUÍMICA E BIOLOGIA
CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM PROCESSOS AMBIENTAIS

GUILHERME LUIZ STOCKLER DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE EFLUENTE KRAFT APÓS TRATAMENTO
POR PROCESSOS OXIDATIVOS AVANÇADOS**

Curitiba

2013

GUILHERME LUIZ STOCKLER DE OLIVIERA

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE EFLUENTE KRAFT APÓS TRATAMENTO
POR PROCESSOS OXIDATIVOS AVANÇADOS**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à banca examinadora,
como requisito à obtenção do título
de Tecnólogo em Processos
Ambientais, do Departamento
Acadêmico de Química e Biologia
(DAQBI), da Universidade
Tecnológica Federal do Paraná
(UTFPR), *Campus* Curitiba

Orientador: Prof.^a Dr.^a Adriane Martins
de Freitas

Co-Orientador: Prof.^a Dr.^a Marlene
Soares

Curitiba

2013

TERMO DE APROVAÇÃO

GUILHERME LUIZ STOCKLER DE OLIVEIRA

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE EFLUENTE KRAFT APÓS TRATAMENTO POR PROCESSOS OXIDATIVOS AVANÇADOS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial à obtenção grau de TECNÓLOGO EM PROCESSOS AMBIENTAIS do Departamento Acadêmico de Química e Biologia (DAQBI) do Campus Curitiba da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR e será avaliado pela seguinte banca:

Membro 1: PROF^a. Dr^a. CLAUDIA REGINA XAVIER

Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR)
Departamento Acadêmico de Química e Biologia

Membro 2: PROF^a. Dr^a. WANESSA RAMSDORF

Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR)
Departamento Acadêmico de Química e Biologia

Orientadora: PROF^a. Dr^a. ADRIANE MARTINS DE FREITAS

Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR)
Departamento Acadêmico de Química e Biologia

Coordenador do curso: PROF^a Dr^a VALMA MARTINS BARBOSA

Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR)
Departamento Acadêmico de Química e Biologia

Curitiba, 2013

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Monômeros de Lignina;	5
Figura 2: Reator utilizado no tratamento do efluente.....	12
Figura 3: Sementes germinadas na placa de Petri com papel filtro umedecido com água deionizada.	13
Figura 4: Medição do comprimento da radícula	14
Figura 5: Células de cebola em mitose..	17
Figura 6: Índice de crescimento relativo (ICR) e índice de germinação (IG) das sementes de <i>Lactuca sativa</i> em função da concentração de glifosato (%) no ensaio de sensibilidade.....	20
Figura 7: Índice de crescimento relativo (ICR) e índice de germinação (IG) das sementes de <i>Lactuca sativa</i> em função da concentração de efluente (%), antes e após tratamento	22
Figura 8: Taxa de imobilidade (%) de náuplios de <i>Artemia salina</i> , em função da concentração de SDS, após 24 e 48h de exposição.....	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Caracterização Química do efluente.	18
Tabela 2: Parâmetros físicos e químicos do efluente kraft antes e após o tratamento por processo UVC/H ₂ O ₂	19
Tabela 3: Comprimento médio das raízes, índice de crescimento relativo (ICR) e índice de germinação (IG) das sementes de <i>Lactuca sativa</i> no ensaios de sensibilidade.	20
Tabela 4: Comprimento médio das raízes, Índice de Crescimento Relativo (ICR) e Índice de Germinação (IG) das sementes de <i>Lactuca sativa</i> em função da concentração de efluente (%), antes (bruto) e após tratamento (tratado).	21
Tabela 5: Taxa de imobilidade (%) de <i>Artemia salina</i> em função da concentração de SDS após 24-48h de exposição.....	23
Tabela 6: Taxa de imobilidade (%) de <i>Artemia salina</i> , em função da concentração de efluente (%), antes (bruto) e após tratamento (tratado).	25
Tabela 7: Índice Mitótico (‰) e Valor Limite de Toxicidade (%) de células de raiz de <i>Allium cepa</i> após exposição ao efluente bruto e tratado	26

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1 Objetivos Gerais.....	3
2.2 Objetivos Específicos	3
3. FUDAMENTAÇÃO TEÓRICA	4
3.1 Papel Kraft – Produção e efluente.....	4
3.2 Processos Oxidativos Avançados.	5
3.3 Ensaio de toxicidade.....	7
3.3.1 Ensaio com <i>Artemia salina</i>	7
3.3.2 Ensaio com <i>Lactuca sativa</i>	8
3.3.3 Ensaio com <i>Allium cepa</i>	9
4. METODOLOGIA.....	10
4.1. Coleta e armazenamento do efluente kraft	10
4.2. Caracterização físico-química do efluente.....	10
4.2.1 Determinação de compostos fenólicos totais.....	10
4.2.2 Determinação de compostos lignínicos.	10
4.2.3 Determinação de cor.....	11
4.2.4 Determinação da demanda química de oxigênio (DQO)	11
4.3 Tratamento por UV-C/H ₂ O ₂	11
4.4. Ensaio de Toxicidade.....	12
4.4.1 Ensaio de Toxicidade Aguda com <i>Lactuca sativa</i>	12
4.4.2 Ensaio de Toxicidade Aguda com <i>Artemia salina</i>	14
4.4.3 Ensaio de Citotoxicidade em <i>Allium cepa</i>	16
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
5.1 Caracterização Física e Química do efluente	18
5.2 Ensaio de Toxicidade.....	19
5.2.1 Ensaio de sensibilidade dos lotes de <i>Lactuca sativa</i>	19
5.2.2 Ensaio de toxicidade aguda com <i>Lactuca sativa</i>	21
5.2.3 Ensaio de sensibilidade com <i>Artemia salina</i>	23
5.2.4 Ensaio de toxicidade aguda com <i>Artemia salina</i>	24
5.2.5 Ensaio de Citotoxicidade (Índice Mitótico) em <i>Allium cepa</i>	26
6. CONCLUSÃO	28
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

RESUMO

OLIVEIRA, G.S. **AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE EFLUENTE KRAFT APÓS TRATAMENTO POR PROCESSOS OXIDATIVOS AVANÇADOS.**

Trabalho de Conclusão de Curso de Tecnologia em Processos Ambientais do Campus Curitiba da Universidade Tecnológica Federal do Paraná. 2011.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a toxicidade de efluentes provenientes do processo de obtenção de celulose kraft, antes e após o tratamento por Processos Oxidativos Avançados (POAs). Os resultados destas análises foram comparados às análises de redução de parâmetros químicos do efluente tratado como COD (Carbono Orgânico Dissolvido), compostos lignínicos, fenólicos, cor, e área espectral em comparação ao efluente bruto. Para avaliação da toxicidade aguda foram realizados bioensaios com *Artemia salina* e sementes de *Lactuca sativa* (alface); para avaliação da citotoxicidade foram realizados ensaios com *Allium cepa* (cebola). Com exceção do ensaio com cebola, os bioensaios apresentaram baixa toxicidade inicial, com decréscimo de toxicidade após tratamento. O ensaio com *Allium cepa* resultou em efeito subletal quando exposta ao efluente bruto, e redução significativa da toxicidade efluente no tratado.

Palavras-chave: Toxicidade aguda, Kraft, Processos Oxidativos Avançados, *Allium cepa*, *Artemia salina*, *Lactuca sativa*.

ABSTRACT

OLIVEIRA, G.S. EVALUATION OF THE TOXICITY IN KRAFT WASTEWATER AFTER TREATMENT WITH ADVANCED OXIDATION PROCESSES.

Completion of course work in Technology in Environmental Process, Campus Curitiba, Federal Technological University of Parana. 2013.

This study aimed to evaluate the toxicity of effluents from kraft cellulose process before and after treatment by Advanced Oxidation Processes (AOPs). The results were compared to chemical parameters such as DOC (Dissolved Organic Carbon), ligninic and phenolic compounds, color and spectral area, of the treated wastewater in comparison to the raw. For evaluation of the acute toxicity, bioassays were conducted with *Artemia salina*, *Lactuca sativa* and to evaluate cytotoxicity assays were conducted with *Allium cepa*. With the exception of the *A. cepa* assay the remaining bioassays presented low initial toxicity, which was further decreased after the treatment. *Allium cepa* assays have resulted in sublethal toxicity when exposed to the raw effluent, and significant decrease of toxicity in the treated one.

Keywords: Acute toxicity, Kraft, Advanced Oxidation Processes, *Allium cepa*, *Artemia salina*, *Lactuca sativa*.

1. INTRODUÇÃO

Existem diversas formas de beneficiamento da madeira, a fim de se aproveitar sua celulose. Cada processo tem suas particularidades, visando um tipo de produto com características próprias e definidas.

O processo Kraft é um processo químico, de polpação, com a finalidade de se separar celulose de lignina, através do contato da madeira com substâncias químicas, cujo resultado é uma celulose com alto teor de lignina residual, o que a deixa mais escura, porém com rendimento e resistência física elevados, podendo, desta forma, ser utilizada para fins mais grosseiros como sacos, embalagens e sacolas (BARRICHELO e BRITO, 1979). Como todo processo que envolve utilização de água, e outros produtos líquidos, existe a produção de um efluente. Este efluente tem como característica alta quantidade de matéria orgânica que consome oxigênio, pH geralmente alto, devido à utilização de bases no processo, possibilidade de alguns compostos organoclorados chamados de halogênios orgânicos adsorvíveis, se o processo for realizado com substâncias cloradas, e alguns compostos presentes que podem ter efeito tóxico na biota aquática, como ácidos resínicos e fitoesteróis, oriundos da madeira, extrativos, e outros. A cor do efluente é escura devido ao residual de lignina que se encontra no efluente, e eventualmente podem ser encontradas fibras residuais (PIOTTO, 2003).

Uma das possíveis formas de tratamentos para efluentes são os Processos Oxidativos Avançados (POAs), mecanismos reacionais no qual o radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$) atua como agente oxidante forte, devido a seu alto poder oxidativo e, portanto, pode mineralizar compostos químicos complexos e tóxicos, relativamente rápido (ANDREOZZI *et al.*, 1999). Uma particularidade desta técnica, é que, devido à reatividade do radical, ele deve ser gerado *in situ* por meio de reações com oxidantes fortes, como ozônio, peróxido de hidrogênio ou luz ultravioleta (ANDREOZZI *et al.*, 1999). Entre os POAs aplicados à remediação de efluentes kraft, destaca-se o processo UV-C/ H_2O_2 devido à sua simplicidade e eficiência. Este processo consiste em irradiar a molécula de H_2O_2 , introduzida no efluente, com radiação UV-C. A radiação irá

então clivar a molécula gerando dois radicais hidroxila, que reagirão com os compostos do efluente, mineralizando-os. Algumas vantagens deste processo são a possibilidade da remediação *in situ*, mineralização de compostos recalcitrantes, ou não biodegradáveis, e possível associação com outros tratamentos (TEIXEIRA e JARDIM, 2004).

Independentemente da forma como efluentes kraft são tratados, existe a necessidade de monitoramento de efluente tratado, não só através de parâmetros químicos e físicos, como especialmente através da avaliação de toxicidade aguda ou crônica em relação à organismos-teste. Testes de toxicidade aguda em *Daphnia similis*, toxicidade crônica em *Ceriodaphnia silvestrii*, e de mutagenicidade em *Allium cepa*, causados por efluente oriundo de processo kraft, tiveram resultados, que comprovam alterações metabólicas e hormonais nos organismos, e que os classificam como tendo alta relevância ambiental (PIRES e CHAPARRO, 2010). Desta forma, o objetivo desta pesquisa foi realizar uma avaliação ecotoxicológica, antes e após tratamento do efluente kraft pelo processo UV-C/H₂O₂, comparando os resultados obtidos com dados de análises químicas, a fim de se observar possíveis relações entre estes e os ensaios de toxicidade.

Neste trabalho a toxicidade das amostras foi testada através da realização de bioensaios com *Artemia salina*, *Lactuca sativa* e *Allium cepa*.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Avaliar a toxicidade aguda e citotoxicidade de efluente kraft antes e após tratamento com Processos Oxidativos Avançados.

2.2 Objetivos Específicos

Verificar a toxicidade aguda do efluente kraft, antes e após tratamento, utilizando bioensaios com *Artemia salina* e sementes de *Lactuca sativa* (alface).

Verificar a citotoxicidade do efluente kraft, antes e após tratamento, utilizando bioensaios com *Allium cepa* (cebola).

Verificar a possível relação entre os parâmetros físicos e químicos como compostos lignínicos, fenólicos, cor, carbono orgânico dissolvido, e área espectral e os dados ecotoxicológicos do efluente kraft em estudo.

3. FUDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Os efluentes gerados nos mais diversos ambientes possuem grande complexidade e variedade, representando um grave problema ambiental caso não sejam tratados e destinados de forma correta.

3.1 Papel Kraft – Produção e efluente

O processo de produção da polpa Kraft consiste na formação de cavacos de madeira, a partir de pinus e eucalipto. Esses cavacos são então cozidos em um hidropulper e destinados ao branqueamento químico. As etapas do branqueamento químico consistem em uma deslignificação com oxigênio, simples ou dupla, um branqueamento inicial com dióxido de cloro, uma extração com peróxido de hidrogênio, um novo branqueamento com dióxido de cloro, uma segunda extração com peróxido de hidrogênio e oxigênio, e uma última adição de dióxido de cloro, podendo haver, entre a primeira aplicação de dióxido e de peróxido, uso de hidrólise ácida seguida de tratamento com ozônio ou álcali (TORRES, MELLO e COLODETTE, 2005.). Processos mais recentemente utilizados buscam substituir o uso de compostos clorados por oxigênio e ozônio, completamente (VIDAL *et al.*, 1999).

Como a formação da polpa kraft é a separação da lignina e da celulose presentes na madeira, o efluente contém muito material orgânico, de difícil degradação microbiológica, uma vez que a lignina é um polímero fenólico como visto na Figura 1 (SALIBA *et al.*, 2001), e como é utilizado cloro no processo de branqueamento, este também se fará presente no efluente. Como resultado disso são formadas substâncias chamadas cloroligninas, que aliadas a presença de resinas e fitoesteróis, conferem toxicidade aos organismos aquáticos e micro-organismos (TORRES, MELLO e COLODETTE, 2005; RUAS, CHAPARRO e PIRES, 2012; VIDAL *et al.*, 1999)

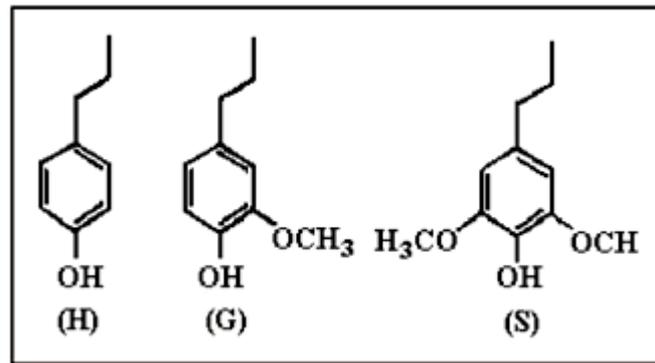


Figura 1: Monômeros de Lignina; H = Hidroxifenila, (G) = Guaiacila, (S) = Siringila. Fonte: SALIBA *et al.*, 2001

Essa toxicidade além de afetar a biota aquática, afeta também os sistemas biológicos de tratamento de efluentes, devido à natureza recalcitrante dos compostos. O tratamento padrão utilizado para este efluente é o sistema de lagoas aeróbicas, acopladas a sistemas anaeróbicos. Estes sistemas são bastante eficientes em remover a matéria biodegradável, mas compostos organoclorados são um problema, e muitas vezes persistem no efluente (VIDAL *et al.*, 1999).

A proposta é verificar se tratamentos com Processos Oxidativos Avançados mineralizam esses compostos, e amenizam esta problemática dos tratamentos convencionais.

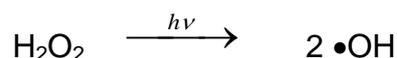
3.2 Processos Oxidativos Avançados.

Processos Oxidativos Avançados (POAs) são mecanismos reacionais nos quais o radical hidroxila age como agente oxidante, devido a seu elevado potencial de oxidação, e permite a mineralização de diversos compostos químicos, em um tempo relativamente baixo, porém deve ser gerado *in situ*, pois possui curto período de atuação, uma vez que o radical é bastante reagente (ANDREOZZI *et. al*, 1999).

As principais vantagens dos POAs, em relação aos outros processos de tratamento são a capacidade de mineralização total do poluente e não somente

a transferência de fase; a capacidade de oxidação de compostos recalcitrantes e não biodegradáveis, como por exemplo, a lignina e outros compostos fenólicos presentes no efluente kraft; a possibilidade de uso combinado com outros processos de tratamento (pré ou pós tratamento); as altas velocidades de reação, normalmente minutos; e a possibilidade de remediação *in situ* (TEIXEIRA e JARDIM, 2004).

Os POAs podem ser divididos em duas classes: a) processos homogêneos: não há a utilização de catalisadores sólidos, e b) processos heterogêneos: há a presença de catalisadores, na forma de semicondutores (NOGUEIRA e JARDIM, 1998). Um exemplo de processo heterogêneo é o utilizado, neste trabalho, o processo de fotólise do H₂O₂, conhecido como UVC/H₂O₂. A reação que origina os radicais hidroxila, a partir de peróxido e radiação ultra-violeta é a seguinte como descrita por MARTINS *et al.* (2011).



Além das vantagens previamente citadas, o tratamento com UV/H₂O₂, apresenta um poder de mineralização alto, entre os POAs, sendo somente inferior ao UV/Fenton e ao UV/TiO₂, e representa um dos custos mais baixos devido a não necessidade de reagentes de difícil acesso (SARITHA *et al.*, 2007).

É importante confirmar a diminuição da toxicidade através de ensaios, uma vez que pode ocorrer formação de compostos intermediários tóxicos, ou a bioativação de moléculas anteriormente inócuas, e o efluente apresentar toxicidade pós-tratamento superior àquela antes de tratada, como relatado por SAUER *et al.* (2006). A necessidade de testes de toxicidade também ocorre, pois em alguns casos mesmo com a eliminação completa de poluentes, ainda há toxicidade, e ela só é diminuída com processos de mineralização sustentados por tempo prolongado (ALBA *et al.*, 2002).

3.3 Ensaio de toxicidade

Os ensaios ecotoxicológicos são de suma importância na disposição de qualquer efluente em corpos hídricos, pois somente os parâmetros físicos e químicos geralmente estabelecidos, como demanda química de oxigênio (DQO) e demanda biológica de oxigênio (DBO), carbono orgânico total (COT), metais, sólidos e outros, não tem a capacidade de diferenciar substâncias que afetarão os sistemas de tratamentos biológicos e os corpos receptores, sendo insuficientes para a avaliação do risco ambiental dos contaminantes (PIRES e CHAPARRO, 2010).

Contudo os ensaios toxicológicos não substituem as análises físico-químicas, que identificam e quantificam contaminantes, e sim avaliam os efeitos biológicos destes em corpos hídricos receptores, de forma que ambos se complementam mutuamente (PIRES e CHAPARRO, 2010).

Os estudos ecotoxicológicos utilizando diversos organismos de níveis tróficos diferentes, são uma ferramenta de comprovada eficiência para avaliar quanto perigoso é um efluente, quando liberado em corpos hídricos, pois integram interações entre misturas complexas de contaminantes presentes no efluente, independentemente de composição física e química (PEREIRA *et al.*, 2009).

Antes de descarregar efluentes tratados no meio ambiente, devem ser feitas avaliações da toxicidade remanescente, através de bioensaios, e não somente analisando-se o potencial de destruição da matéria original e a quantidade de Carbono Orgânico Total (PINTAR *et al.*, 2004).

3.3.1 Ensaio com *Artemia salina*.

Invertebrados são comumente utilizados na avaliação toxicológica de águas residuárias. *Artemia salina* é empregada na detecção de compostos bioativos, em produtos naturais, de produtos químicos antropogênicos no meio ambiente, e investigações dos processos bioquímicos mediando toxicidade aguda. Os ensaios com este organismo são de especial interesse, pois há

disponibilidade comercial dos cistos, que podem ser armazenados em laboratório por grandes períodos, o ensaio é rápido, simples possui baixo custo, e necessita de pequenos volumes de amostra (RIZZO, 2011).

A *A. salina* é um microcrustáceo de elevada importância ambiental, pois apresenta um papel fundamental no fluxo de energia na cadeia de alimentação, sendo um dos principais componentes da ecologia de ambientes de água salina e marinha, e este organismo é amplamente utilizado para realização de ensaios de toxicidade, através da concentração letal média, para diversas substâncias (PARRA et al., 2001).

3.3.2 Ensaio com *Lactuca sativa*.

Para os bioensaios de alongamento de raiz e taxa de germinação de sementes, o USEPA (1996), aconselha a utilização de sementes de *Lactuca sativa*, pois esta espécie é de relevância econômica e ecológica.

A fitotoxicidade pode ser expressa como atraso de germinação, inibição de crescimento e de germinação, e qualquer outro efeito adverso causado por substâncias específicas ou condições ambientais (RUDNIK, 2008).

A amostra pode não apresentar efeito negativo inicialmente, mas devido à formação de compostos inorgânicos, com o tempo, pode haver fitotoxicidade (RUDNIK, 2008).

A alface é um organismo indicado para análises ecotoxicológicas por representar um vegetal amplamente cultivado, utilizado em grande escala na alimentação, humana e animal, e vulnerável a contaminações por irrigação contendo águas residuárias (GIORGETTI et al., 2011).

Segundo PELEGRINI et al. (2009), as sementes de alface foram excelentes organismos para bioensaios de toxicidade de efluentes tratados por processos de fotocatalise UVC/H₂O₂ pois, apresentaram alta sensibilidade ao estresse químico, bem como rápidas germinação e reidratação, garantindo a reprodutibilidade do ensaio.

3.3.3 Ensaio com *Allium cepa*.

Ensaio de toxicidade em cebolas são aconselhados por terem baixo custo, serem de fácil manuseio, e por terem DNA facilmente visualizado, são excelentes indicadores. Além disso o ensaio com cebola permite a avaliação de múltiplos parâmetros, como citotoxicidade com índice mitótico, genotoxicidade com anormalidades cromossômicas, e mutagenicidade com micronúcleos, de forma que permite a avaliação do mecanismo do poluente sobre o material genético (LEME e MARIN, 2009)

Historicamente, plantas são utilizadas como organismos indicadores de mutagênese em eucariontes superiores. Plantas tem uma variedade de efeitos facilmente observáveis como alterações na ploidia, aberrações cromossômicas e intercâmbio entre cromátides irmãs. O ensaio com cebolas é validado pelo Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP em inglês) como um padrão eficiente para o monitoramento de genotoxicidade e mutagenicidade, uma vez que é utilizado para tal, desde a década de 1920 (KUMARI, MUKHERJEE e CHANDRASEKARAN, 2009).

Para avaliação de citotoxicidade e genotoxicidade o ensaio com *Allium cepa* é considerado um dos mais eficazes e sensíveis testes para detecção de mutagênicos de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) (KWANKUA et al., 2010).

Dentre as vantagens de se trabalhar com ensaios com cebolas estão, a disponibilidade de bulbos, o ano todo, os ensaios têm baixo custo, e não necessitam de equipamento ou condições especiais para seu cultivo, as raízes se desenvolvem rapidamente e em grande número, os cromossomos são relativamente grandes, e a duração do ciclo mitótico permite a realização do ensaio em curtos períodos (GRANT, 1982).

4. METODOLOGIA

4.1. Coleta e armazenamento do efluente kraft

Para os ensaios de toxicidade foram utilizadas amostras de efluente bruto obtidas em uma indústria de celulose kraft situada na região de Curitiba, e amostras do efluente após tratamento por UV/H₂O₂ realizado no laboratório de Biotecnologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). As amostras brutas foram coletadas na calha Parshall do sistema de tratamento da empresa, após a homogeneização do efluente. O efluente foi armazenado a -20°C até um dia antes da realização dos experimentos que ocorreram em até 30 dias após a coleta, para preservação das características. Um dia antes dos ensaios as amostras foram descongeladas em refrigerador a 4°C.

4.2. Caracterização físico-química do efluente

A caracterização química do efluente foi realizada no Laboratório de Biotecnologia do Departamento Acadêmico de Química e Biologia (DAQBI) da UTFPR.

4.2.1 Determinação de compostos fenólicos totais

Primeiramente uma curva analítica de fenol com soluções de diversas concentrações conhecidas foi realizada. Utilizou-se o comprimento de onda de 215 nm. As análises foram realizadas segundo metodologia previamente descrita (APHA, 1999). Para as análises misturou-se 2 mL de solução tampão de KH₂PO₄ e 2 mL de amostra. A mistura foi homogeneizada e analisada em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 215 nm.

4.2.2 Determinação de compostos lignínicos.

Foi adicionado em um béquer de 100 mL, 5 mL de amostra. O pH da amostra foi medido, em agitação, através de um pHmetro, previamente calibrado. O pH da amostra foi ajustado para 7,0 com soluções a 0,01mol/L de NaOH e H₂SO₄, com o auxílio de um conta-gotas. A análise ocorreu em espectrofotômetro no comprimento de onda de 280 nm (APHA,1999).

4.2.3 Determinação de cor

Com o auxílio de uma micropipeta, adicionou-se 5 mL da amostra, em um béquer de 100 mL. O pH foi medido em agitação, através de um pHmetro, previamente calibrado. Ajustou-se o pH da amostra para 9,0 com soluções a 0,01mol/L de NaOH e H₂SO₄, com o auxílio de um conta-gotas. As amostras foram analisadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 440 nm (APHA, 1999).

4.2.4 Determinação da demanda química de oxigênio (DQO)

Foi preparada uma curva de calibração com soluções de diversas concentrações de biftalato de potássio 4mg/L tratado com 3,5mL de solução digestora (10,216g de K₂Cr₂O₇, 33,00g de HgSO₄, 168 mL de H₂SO₄ em 1000 mL) e catalítica (10,7g de AgSO₄ em 1000 mL de H₂SO₄ concentrado). Com o auxílio de uma micropipeta, adicionou-se em tubos de amostra de 10 mL, 2 mL de amostra, 2 mL de solução digestora e 2 mL de solução catalítica, é necessário que as alíquotas sejam colocadas nesta ordem. As amostras foram colocadas em digestor por 2 horas a 148°C. Após o período de digestão, aguardou-se o resfriamento a análise foi então feita em espectrofotômetro no comprimento de onda de 600 nm (APHA, 1999).

4.3 Tratamento por UV-C/H₂O₂

Os experimentos foram conduzidos de acordo com metodologia adaptada de MARMITT, PIROTTA e STÜLP (2010) em um reator de borossilicato de bancada, com 500 mL de capacidade, equipado com refrigeração por água e agitação magnética, como ilustrado na Figura 2.

A radiação ultravioleta foi proporcionada por uma lâmpada a vapor de mercúrio de média pressão de 125W (sem o bulbo protetor), inserida na solução por meio de um bulbo de quartzo.

Para o tratamento por processo UV-C/H₂O₂, foram utilizados 500 mL do efluente previamente filtrado e diluído (1:12), com valores otimizados de pH (4) e de peróxido de hidrogênio (60 mg/L). O efluente foi tratado por 40 minutos.



Figura 2: Reator utilizado no tratamento do efluente.

4.4. Ensaio de Toxicidade

4.4.1 Ensaio de Toxicidade Aguda com *Lactuca sativa*

Este ensaio foi baseado no protocolo 850.4200 (USEPA, 1996). As sementes foram obtidas comercialmente, e não tinham sido tratadas com nenhum tipo de herbicida ou inibidor de crescimento, para que não houvesse interferência na análise. Elas foram armazenadas em geladeira até os ensaios, para garantir a longevidade do lote. Antes da realização dos ensaios de toxicidade, foi realizada a carta-controle dos lotes de sementes para avaliar a sua sensibilidade em relação a um agente tóxico (glifosato), a sua viabilidade e variabilidade nos resultados. Em uma placa de Petri, foram colocadas dez sementes sobre papel-filtro embebido com 4 mL de solução de glifosato em diversas concentrações (0,25%, 0,5%, 0,75%, 1% e 2%). Da mesma forma, sementes expostas a água deionizada constituíram o controle negativo. As

placas foram envolvidas em filme plástico para evitar evaporação das soluções e incubadas a 23°C por 5 dias (Fig.3). Foram realizados 10 ensaios em triplicata para compor a carta controle. Para cada novo lote de sementes, o mesmo procedimento foi realizado.

Após a realização da carta controle, o teste de toxicidade foi feito conforme metodologia anteriormente descrita. Foram utilizadas 4 diluições do efluente (25%, 50%, 75%, 100%), um controle negativo, composto por água deionizada, e um controle positivo composto por uma solução 2% de glifosato, para validação do ensaio. O mesmo método foi utilizado tanto para o efluente bruto quanto para o tratado por processo UVC/H₂O₂.

Após este período foi observado o número de sementes germinadas em cada placa bem como o comprimento das radículas (Figuras 3 e 4). Só foram consideradas válidas as replicatas onde o controle negativo teve germinação superior ou igual a 90%.



Figura 3: Sementes germinadas na placa de Petri com papel filtro umedecido com água deionizada.

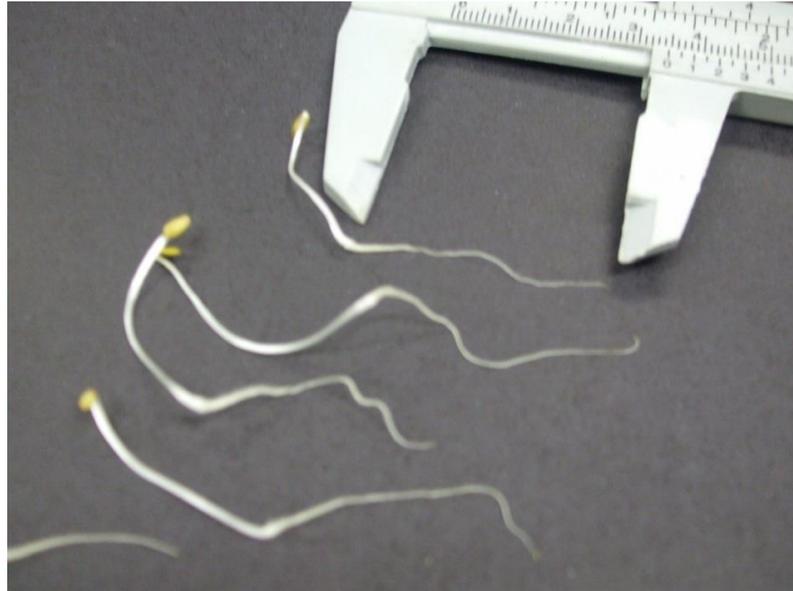


Figura 4: Medição do comprimento da radícula

A partir dos dados de germinação e comprimento de radícula foi calculado o Índice de Crescimento Relativo (ICR) e o Índice de Germinação (IG), para uma melhor e mais clara visualização da influência dos efluentes (YOUNG et al., 2012). O cálculo desses valores foi feito seguindo as equações (1) e (2) a seguir:

$$1. ICR = CRA / CRC$$

$$2. IG = ICR \times (SGA / SGC) \times 100$$

onde, CRA é o Comprimento da Radícula na Amostra, CRC é o Comprimento da Radícula no Controle Negativo, SGA é o número de Sementes Germinadas da Amostra e SGC é o número de Sementes Germinadas no Controle Negativo.

4.4.2 Ensaio de Toxicidade Aguda com *Artemia salina*

O ensaio com *A. salina* foi realizado segundo metodologia inicialmente descrita por Vanhaecke e Sorgeloos (1981). Os cistos de alta eclosão e o sal marinho artificial foram adquiridos em loja de artigos para aquários. Para o

cultivo inicial dos organismos utilizou-se água marinha sintética (35mg/L de sal em 500mL de água deionizada). Esta solução juntamente com aproximadamente 1g de cistos foi colocada em funil de separação com aeração constante por bomba de aquário. Após 24h, os cistos não eclodidos foram removidos do sistema e uma nova solução de água marinha foi adicionada. Após 48h, a partir do início da eclosão, os organismos foram transferidos para placas de 24 poços, de maneira que em cada poço houvesse 10 organismos e 2mL de solução teste. As placas foram colocadas em estufa BOD sem fotoperíodo a 20°C. Os náuplios foram então expostos ao tóxico e foi feita a leitura de organismos imóveis, após 24 e 48h, com auxílio de lupa estereoscópica. Foi considerado imóvel todo organismo que não apresentou movimento em até 10 segundos.

Foram realizados ensaios de sensibilidade, para confirmar que a resposta dos organismos frente ao agente tóxico, era proporcional à concentração. Para isto, foi utilizado Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) nas concentrações de 12, 16, 21, 27, 35mg/L e os organismos foram expostos por 48h, sendo leituras realizadas em 24 e 48h. Este ensaio foi conduzido com cinco placas, cada uma contendo 4 réplicas.

Após os testes de sensibilidade, foram realizados os testes de toxicidade com o efluente bruto e tratado por processo UVC/H₂O₂, nas concentrações de 25%, 50%, 75% e 100%, além de um controle negativo, cuja composição era água marinha sintética, e um controle positivo, uma solução 100mg/L de SDS. A exposição ao efluente durou 48h e foram feitas leituras em 24 e 48h. Este ensaio foi conduzido com dez placas, cada uma contendo 4 réplicas.

Todas as diluições foram realizadas em água marinha sintética e no efluente puro foi feita correção de salinidade com adição do próprio sal marinho artificial.

A partir das leituras, foi estabelecida uma relação entre mortalidade e as concentrações de efluente.

4.4.3 Ensaio de Citotoxicidade em *Allium cepa*

Os ensaios foram realizados segundo metodologia descrita por GRANT (1982), com adaptações. Bulbos de *A. cepa* (cebola), sem pesticidas agrícolas ou inibidores de crescimento, adquiridos comercialmente, foram colocados em frascos contendo água deionizada, para o desenvolvimento de raízes, até que essas alcançassem o comprimento de 2cm aproximadamente. Nesse período a água foi trocada a cada 24h.

Após esse período inicial, as cebolas foram expostas ao efluente bruto e tratado, sem diluições, durante 24h. Além do efluente, havia um frasco com controle negativo, constituído apenas por água deionizada, e um frasco com controle positivo, formado por uma solução 100mg/L de CuSO_4 .

As raízes foram retiradas das cebolas, fixadas em Carnoy (solução 3:1 de álcool etílico e ácido acético) durante 8h, hidrolisadas por 5 minutos em HCl 1mol/L, colocadas em placas de Petri contendo o corante orceína acética 2% e aquecidas em bico de Bunsen até vaporização da orceína, por três vezes. A raiz foi então colocada em lâmina de microscopia, embebida em mais uma gota de orceína acética, e esmagada com uma lamínula para observação em microscópio óptico.

No microscópio óptico foram avaliadas quantas células se encontravam em qualquer uma das fases da mitose, conforme mostra a Figura 5. Foram feitas três lâminas por tratamento e em cada lâmina foram contadas 1000 células (RADIĆ *et al.*, 2010). A partir desse número obteve-se o Índice Mitótico (IM) que quantifica quantas células, a cada mil, estão em mitose (KUMARI, MUKHERJEE e CHANDRASEKARAN, 2009). O Valor Limite de Citotoxicidade foi calculado a partir da equação 3 (MIGID, AZAD e IBRAHIM, 2007):

$$3. \text{ Valor de Toxicidade Limite} = \text{IMA/IMC} \times 100$$

Onde, IMA é o Índice Mitótico na Amostra, e IMC é o Índice Mitótico no controle negativo.

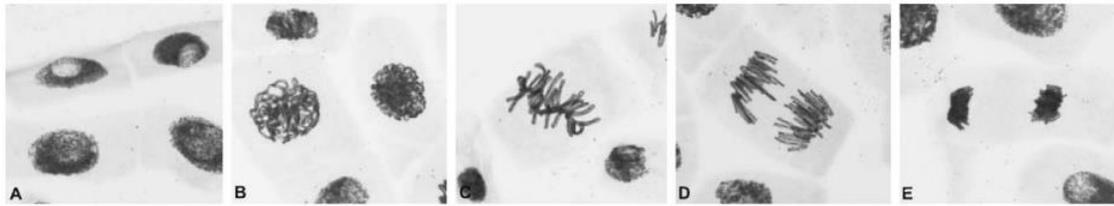


Figura 5: Células de cebola em mitose. A = interfase, B = Prófase, C = metáfase, D = anáfase, E = telófase. LEME e MARIN, 2009.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização Física e Química do efluente

Os dados de caracterização do efluente bruto e tratado por UVC/H₂O₂ estão dispostos na Tabela 1. Os dados foram fornecidos pelo Laboratório de Biotecnologia da UTFPR.

Tabela 1: Caracterização Química do efluente.

Amostra	Parâmetro	Resultado
Bruto	Turbidez (NTU)	129
	OD (mg/L)	6,41
	pH	10,46
	Sólidos totais (g/L)	1,62
	DBO (0,45 µm) (mg/L)	414
Filtrado	Turbidez (NTU)	60,2
	Cor verdadeira (440 nm)	0,41
	Cor aparente (440 nm)	0,73
	Fenóis Totais (ppm)	83,59
	COD (ppm)	315,85
	DQO (ppm O ₂)	1047,69
Filtrato e diluído (1:12)	Turbidez (NTU)	3,04
	Cor verdadeira (440 nm)	0,0294
	Cor aparente (440 nm)	0,0532
	Varredura (area) (u.a.)	106,41
	Fenóis totais (ppm)	17,75
	pH	8,98
	COD (ppm)	21,06
	DQO ppm O ₂)	69,85
	Lignínicos (280nm)	0,49
Tratado	Varredura (area) (u.a.)	53,80
	Cor aparente (440 nm)	0,0348
	Cor verdadeira (440 nm)	0,0237

Para fins de análise do efluente antes e após o tratamento, foram utilizados os parâmetros de área espectral, carbono orgânico dissolvido, cor verdadeira e aparente, compostos lignínicos e fenólicos por terem apresentado

melhor reprodutibilidade. Como pode ser verificado na Tabela 2, houve redução significativa nas principais características do efluente após o tratamento com processo UVC/H₂O₂.

Tabela 2: Parâmetros físicos e químicos do efluente kraft antes e após o tratamento por processo UVC/H₂O₂.

Parâmetro	Pré-tratamento	Pós-tratamento	% redução
Cor verdadeira (440 nm)	0,4144±0,0000	0,0237 ± 0,0026	94,28
Cor aparente (440 nm)	0,7261±0,0002	0,0348 ± 0,0009	95,21
Compostos lignínicos (280 nm)	0,4944	0,2940 ± 0,0065	40,53
Compostos fenólicos (mg/L)	17,75	3,67 ± 0,08	79,32
Área espectral (u.a.)	106,41	53,80 ± 2,08	49,44

5.2 Ensaio de Toxicidade

5.2.1 Ensaio de sensibilidade dos lotes de *Lactuca sativa*

Com intuito de verificar a sensibilidade das sementes utilizadas nos bioensaios, as mesmas foram expostas à diferentes concentrações do agente estressor (glifosato). Como controle negativo foi utilizada água destilada e deionizada. Os resultados, expressos na forma crescimento médio das raízes (cm), Índice Relativo de Crescimento (ICR) e Índice de Germinação (IG), são dispostos a seguir na Tabela 3 e Figura 6.

Tabela 3: Comprimento médio das raízes, índice de crescimento relativo (ICR) e índice de germinação (IG) das sementes de *Lactuca sativa* no ensaio de sensibilidade.

Concentração (% de glifosato)	Comprimento médio das raízes (cm)	ICR	IG (%)
0	1,74±0,45	1	100
0,25	0,47±0,03	0,27	21,61
0,5	0,37±0,04	0,21	14,82
0,75	0,31±0,04	0,18	12,45
1	0,16±0,07	0,09	4,39
2	0,03±0,05	0,02	0,24

Legenda: ICR = Índice de Crescimento Relativo, e IG = Índice de Germinação

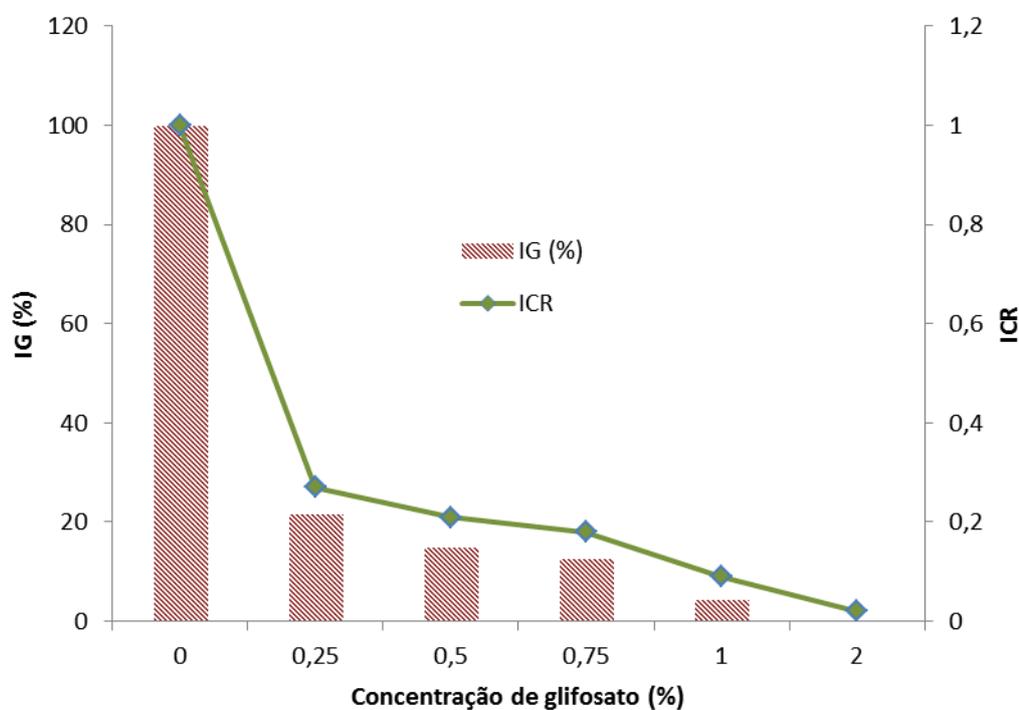


Figura 6: Índice de crescimento relativo (ICR) e índice de germinação (IG) das sementes de *Lactuca sativa* em função da concentração de glifosato (%) no ensaio de sensibilidade

Como pode ser observado tanto na Tabela 3 quanto na Figura 6, a carta-controlé comprovou a sensibilidade dos lotes de sementes ao glifosato, uma vez que elas tiveram resposta de toxicidade com dependência na concentração. Percebe-se que com o incremento da concentração de glifosato, tanto o comprimento, quanto a taxa de germinação das sementes diminuiu consideravelmente, chegando próxima à zero na maior concentração. Como resultado foi realizado o ensaio final, com os efluentes antes e pós-tratamento.

5.2.2 Ensaio de toxicidade aguda com *Lactuca sativa*.

Com os resultados dos bioensaios de toxicidade com *L. sativa*, foram mensuradas as seguintes relações. Para o efluente temos os resultados contidos na Tabela 4 e na Figura 7.

Tabela 4: Comprimento médio das raízes, Índice de Crescimento Relativo (ICR) e Índice de Germinação (IG) das sementes de *Lactuca sativa* em função da concentração de efluente (%), antes (bruto) e após tratamento (tratado).

EFLUENTE (%)	EFLUENTE BRUTO			EFLUENTE TRATADO		
	Comprimento médio raiz (cm)	ICR	IG(%)	Comprimento médio raiz (cm)	ICR	IG(%)
0	1,23±0,38	1	100	1,00±0,17	1	100
25	1,15±0,08	0,93	89,84	0,93±0,05	0,93	90,13
50	0,94±0,08	0,76	73,68	0,99±0,10	0,99	95,65
75	0,89±0,03	0,72	64,72	1,02±0,11	1,02	87,93
100	0,75±0,09	0,6	60,37	0,90±0,20	0,9	74,77

Legenda: ICR = Índice de Crescimento Relativo, e IG = Índice de Germinação

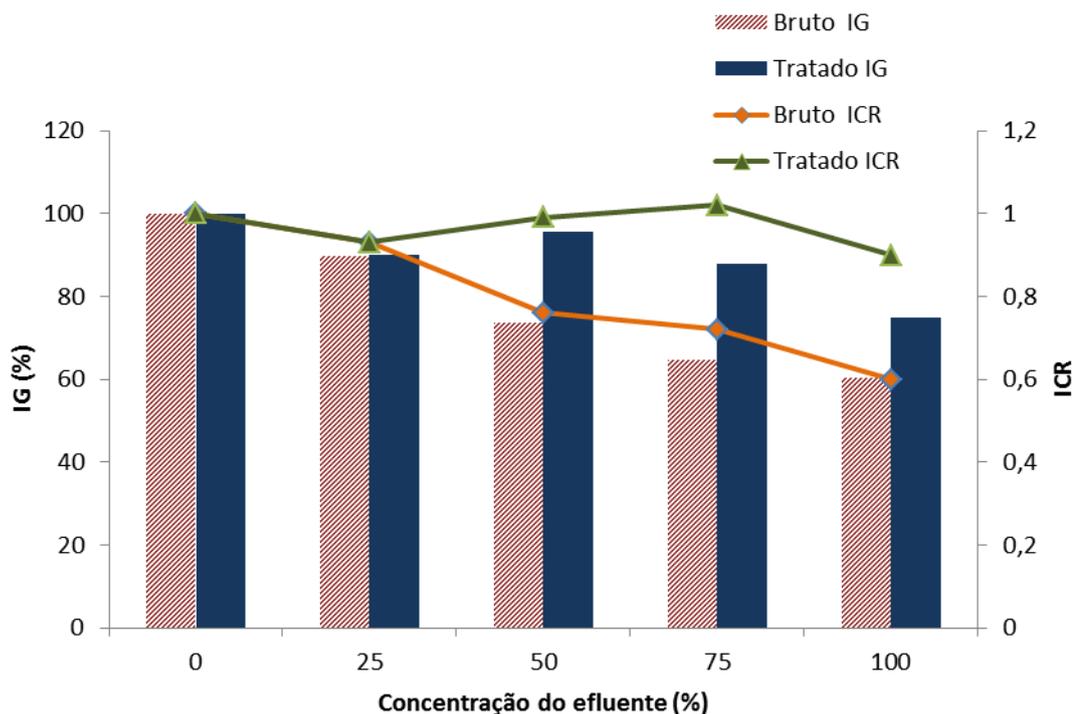


Figura 7: Índice de crescimento relativo (ICR) e índice de germinação (IG) das sementes de *Lactuca sativa* em função da concentração de efluente (%), antes (bruto) e após tratamento (tratado).

Observando a Figura 7 e considerando como inibição do crescimento das sementes todo resultado de IG abaixo de 80% (de 80 a 120% não é considerado efeito significativo e valores acima de 120% são considerados estímulo de crescimento) (YOUNG et al., 2012), temos que o efluente bruto apresenta toxicidade a partir de uma concentração de aproximadamente 40%, e no efluente puro, as sementes apresentaram uma inibição moderada, crescendo aproximadamente 60% em relação ao controle negativo.

No efluente tratado houve diminuição nesta toxicidade, de forma que só ocorreu toxicidade significativa a partir de uma concentração de aproximadamente 90% de efluente, e no efluente puro as sementes tiveram crescimentos próximos a 75% do controle negativo. Pode-se perceber que no efluente puro a diferença de crescimento é de apenas 15%, porém a diferença entre a primeira diluição que apresenta toxicidade, para ambas as amostras, é de quase 50%, logo, o tratamento foi eficaz não só na redução de parâmetros

químicos, mas também na toxicidade aguda, frente à *Lactuca sativa*. Resultados de estudos anteriores confirmam que o tratamento de efluentes por POAs reduz a toxicidade das amostras. No estudo de PELEGRINI *et al* (2009) houve redução de 80% da toxicidade de efluente contendo chorume tratado por processo de UVC/H₂O₂, sendo que a concentração de efeito não observável para este efluente passou de 15% a 27%. A redução do efeito tóxico foi confirmada por outros organismos neste mesmo estudo. Além do tratamento com UVC/H₂O₂, os testes de toxicidade também foram aplicados a efluentes têxteis após tratamento fotocatalítico com TiO₂ e TiO₂/H₂O₂, o resultado obtido foi que durante o processo de tratamento, ocorria aumento de toxicidade, porém o resíduo tratado possuía uma toxicidade inferior à do efluente bruto. Assim como este estudo, contudo, não houve toxicidade significativa na amostra inicial (GARCIA, 2009).

5.2.3 Ensaio de sensibilidade com *Artemia salina*.

Com o objetivo de garantir a qualidade do lote de crustáceos obtidos, e sua respectiva sensibilidade frente ao afluente, foram feitos ensaios de sensibilidade com *A. salina* com dodecil sulfato de sódio (SDS), resultando na Figura 8 e na Tabela 5, abaixo.

Tabela 5: Taxa de imobilidade (%) de *Artemia salina* em função da concentração de SDS após 24-48h de exposição.

Concentração de SDS (mg/L)	% imobilidade em 24h	% imobilidade em 48h
0	3,50±0,49	5,00±0,51
12	3,00±0,57	10,50±0,94
16	8,00±0,83	33,50±1,09
21	5,00±0,76	47,00±1,59
27	12,50±1,02	79,50±1,32
35	46,00±1,85	98,00±0,62

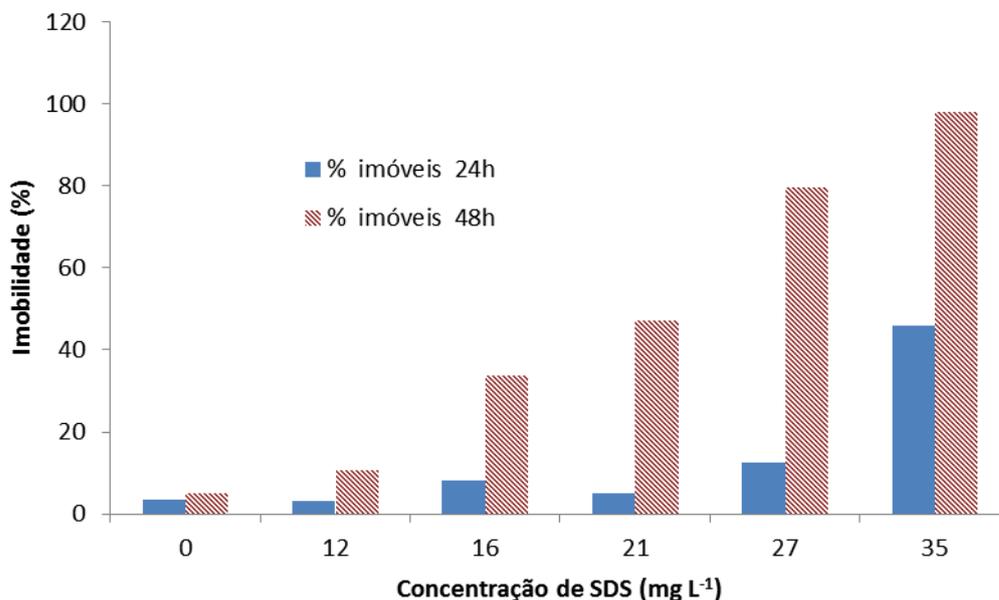


Figura 8: Taxa de imobilidade (%) de náuplios de *Artemia salina*, em função da concentração de SDS, após 24 e 48h de exposição.

Foi observado que o lote é viável, pois teve resposta diretamente proporcional à concentração do agente tóxico, mesmo apresentando uma resistência levemente elevada no ensaio de 24h, o de 48h, que foi a duração do ensaio com efluente que revelou resultados bastante satisfatórios, apresentando CL50 de aproximadamente 21mg/L de SDS.

5.2.4 Ensaio de toxicidade aguda com *Artemia salina*

A fim de confirmar os resultados obtidos com os ensaios de alface, e garantir confiabilidade ao trabalho, foi realizado o ensaio com *A. salina*, para os quais se obtiveram os resultados a seguir.

Tabela 6: Taxa de imobilidade (%) de *Artemia salina*, em função da concentração de efluente (%), antes (bruto) e após tratamento (tratado).

Concentração do Efluente (%).	EFLUENTE BRUTO		EFLUENTE TRATADO	
	24h	48h	24h	48h
0	3,00±0,46.	4,00±0,50	2,50±0,44	3,00±0,46
25	5,50±0,68	7,75±0,46	2,75±0,55	3,75±0,70
50	4,50±0,68	10,25±0,83	1,75±0,59	3,50±0,62
75	2,50±0,59	8,00±0,76	1,00±0,30	3,50±0,48
100	3,50±0,70	14,50±1,01	2,00±0,46	4,75±0,60

Como pode ser observada na Tabela 6, a toxicidade do efluente sobre o organismo, mesmo antes do tratamento, é baixa, de forma que não há influencia significativa na toxicidade abaixo da concentração de 100% no efluente pré-tratamento.

O ensaio com o efluente tratado foi realizado para garantir que não há a formação ou bioativação de compostos tóxicos pelo tratamento como ocorreu no estudo de SAUER *et al.* (2006) cujo efluente tratado apresentava valor de toxicidade superior ao bruto. O resultado foi uma toxicidade ainda menor que a anterior, de forma que a pouca toxicidade que existia, foi praticamente eliminada.

Segundo RIZZO (2011), ensaios com *A. salina*, foram realizados para detecção da redução de toxicidade em efluentes de celulose tratados por POAs diversos como UV/TiO₂, UV/H₂O₂ e UV/TiO₂/H₂O₂. Foi comprovado que após tratamentos, o efluente teve mortalidade dos organismos diminuída e uma biodegradabilidade (relação DQO/DBO) aumentada. Logo, os resultados se encaixam dentro do relatado na literatura.

5.2.5 Ensaio de Citotoxicidade (Índice Mitótico) em *Allium cepa*

De acordo com os resultados obtidos nos bioensaios com *L. sativa* e *A. salina*, a toxicidade aguda do efluente bruto não se mostrou muito significativa. Neste sentido, ensaios de citotoxicidade avaliando o índice mitótico (IM) de células de raiz de *A. cepa* (cebola) foram realizados com o efluente bruto e tratado, sem diluições. Os resultados deste ensaio, em função do IM (‰) e do Valor Limite de Toxicidade (%) estão na Tabela 7.

Tabela 7: Índice Mitótico (‰) e Valor Limite de Toxicidade (%) de células de raiz de *Allium cepa* após exposição ao efluente bruto e tratado

Amostra	Índice Mitótico (‰)	Valor Limite de Toxicidade (%)
H ₂ O deionizada (Controle negativo)	188,33±16,50	-
Efluente Tratado	119±26,85	61,19
Efluente Bruto	63,33±5,69	33,63
CuSO ₄ 100mg/L (Controle Positivo)	7,67±1,53	4,07

Para este ensaio, tem-se que Valores de Limite de Toxicidade abaixo de 50% tem efeito subletal, e abaixo de 22%, letal (MIGID, AZAB e IBRAHIM, 2007). Desta forma, é possível deduzir que antes do tratamento, havia efeito tóxico subletal no organismo, e após o tratamento, esse efeito foi eliminado, embora a divisão celular tenha sido inibida.

Segundo estudo realizado por ROA, YEBER e VENEGAS (2012), efluentes oriundos de um processo de branqueamento de celulose, resultaram em inibição do crescimento no meristema apical da raiz da cebola em altas

concentrações de efluente, apresentando então uma elevada citotoxicidade de forma que havia um decréscimo no IM. Consequentemente, houve decréscimo nos índices de metáfase, anáfase e telófase dos organismos.

PIRES e CHAPARRO (2010), realizaram um estudo sobre a remoção da toxicidade de um efluente de branqueamento de celulose por processo Kraft, através de biomassa imobilizada, utilizando como ensaio padrão de citotoxicidade o teste com cebolas. Obtiveram valores de 25, 6 e 23, em 5000, para o controle negativo, o efluente pré-tratamento, e o efluente após o tratamento proposto por eles, respectivamente. O estudo confirmou a existência da citotoxicidade no efluente do processo kraft, e a eficiência do tratamento na redução dos compostos que causavam esta toxicidade.

Desta forma, os resultados deste trabalho, apresentando 61% de valor limite de toxicidade, para o tratado e 33% para o bruto, estão em concordância com os de outros trabalhos realizados, e pode-se inferir que os ensaios foram realizados com confiabilidade.

6. CONCLUSÃO

A produção de efluentes, em um processo industrial, é inevitável, e pode acarretar danos ao ambiente, quando este é mal gerenciado, ou tratado de maneira incorreta ou ineficaz. O processo de obtenção de celulose Kraft é bastante utilizado no mundo inteiro, e o próprio processo é bastante variável, de forma que o efluente não é facilmente caracterizado.

Um tratamento possível para tal efluente é o UV/H₂O₂, no qual a molécula de peróxido é clivada pela radiação e forma dois radicais hidroxila, que reagem com o efluente, mineralizando-o. Os ensaios e caracterização química presente nos resultados do trabalho, mostram que para este efluente, em particular, a redução de parâmetros químicos considerados poluentes, foi significativa, e mesmo talvez não sendo suficiente como tratamento único, se acoplado a outros tratamentos poderia alcançar uma otimização da eliminação de compostos recalcitrantes.

Como resultado dessa redução, a toxicidade do efluente, quando existia, foi reduzida em aproximadamente 30% para *Allium cepa*, 10% para *Artemia salina* e 15% para *Lactuca sativa*. O bioensaio mais sensível a este efluente foi o de *Allium cepa*, que chegou a apresentar toxicidade subletal no efluente bruto, e no tratado, embora houvesse inibição da divisão celular, esse efeito não foi apresentado. O ensaio com alface teve uma sensibilidade mediana, de forma que o efluente bruto apresentou alguma toxicidade, mesmo que baixa, enquanto o tratado apresentou níveis ainda inferiores, quase não apresentando toxicidade. Já no ensaio com *Artemia salina*, para este efluente, não houve toxicidade significativa, inicialmente, embora o efluente tratado tenha conseguido diminuir a mortalidade ínfima, de 14%, do resultado anterior. Seria interessante fazer o estudo de toxicidade crônica com *Daphnia magna* e *Lactuca sativa* para confirmar estes resultados, no futuro, bem como, buscar organismos mais sensíveis a este efluente em particular.

Feitas estas observações pode-se inferir que o tratamento com UVC/H₂O₂ diminuiu a toxicidade, e não ocasionou o fenômeno de bioativação ou formação de intermediários tóxicos para os organismos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBA, A.R.F.; HERNANDO, D.; AGÜERA, A.; CÁCERES, J.; MALATO, S. Toxicity assays: a way for evaluating AOPs efficiency. **Water Research**, n. 36, p.4255–4262, 2002.

ANDREOZZI, R.; CAPRIO, V.; INSOLA, A.; MAROTTA, R. Advanced oxidation processes (AOP) for water purification and recovery. **Catalysis Today**, n. 53, p. 51-59, 1999.

APHA, AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION in: **Standard Methods For Examination of Water And Wastewater**, 190 Ed., American Public Health Association: Washington D.C, 1999.

BARRICHELO, L. E.G.; BRITO, J. O. A Utilização de Madeira na Produção de Celulose. **Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais**, Circular Técnica n.68, p.1-12, 1979.

GARCIA, J.C; SIMIONATO, J.I; ALMEIDA, V.C; PALÁCIO, S.M; ROSSI, F.L; SCHNEIDER, M.V; SOUZA, N.E. Evolutive Follow-up of the Photocatalytic Degradation of Real Textile Effluents in TiO₂ and TiO₂/H₂O₂ Systems and their Toxic Effects on *Lactuca sativa* Seedlings. **Journal Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v.20, n.9, 2009.

GIORGETTI, L.; TALOUIZTE, H.; MERZOUKI, M.; CALTAVUTURO, L.; GERI, C.; FRASSINETTI, S. Genotoxicity evaluation of effluents from textile industries of the region Fez-Boulmane, Morocco: A case study. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, n.74, p. 2275–2283, 2011.

GRANT, W. F. Chromosome aberration assays in *Allium*, a report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutation Research**, n.99, p. 273-291, 1982.

KUMARI, M.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. Genotoxicity of silver nanoparticles in *Allium cepa*. **Science of the Total Environment**, n.407, p.5243–5246, 2009.

KWANKUA, W.; SENGSAI, S.; KULEUNG, C.; EUAWONG, N. Sunlight decreased genotoxicity of azadirachtin on root tip cells of *Allium cepa* and *Eucrosia bicolor*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, n. 73, p. 949–954, 2010.

LEME, D. M.; MARIN, M. A. M. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research**, v. 682, p.71–81, 2009.

MARMITT, Sandro; PIROTTA, Lilian V.; STULP, Simone. Aplicação de fotólise direta e UV/H₂O₂ a efluente sintético contendo diferentes corantes alimentícios. **Química Nova**. Vol.33, n.2, pp. 384-388, 2010.

MARTINS, L. M.; SILVA, C. E.; MOITA NETO, J. M.; LIMA, A.S.; MOREIRA, R.F.P.M. Aplicação de Fenton, foto-Fenton e UV/H₂O₂ no tratamento de efluente têxtil sintético contendo o corante Preto Biozol UC. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v.16, n.3, p.261-270, jul/set 2011.

MIGID, H. M.A.; AZAB, Y. A.; IBRAHIM, W. M. Use of plant genotoxicity bioassay for the evaluation of efficiency of algal biofilters in bioremediation of toxic industrial effluent. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.6, n.1, p.57-64. 2007.

NOGUEIRA, R.P.; JARDIM, W.F. A fotocatalise heterogênea e a sua aplicação ambiental. **Química Nova**, v.21 (1), p.69-72, 1998.

PARRA, A. L.; YHEBRA, R.S.; SARDIÑAS, I. G.; BUELA, L. I. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. **Phytomedicine**, v. 8(5), p. 395–400, 2001

PEREIRA, R.; ANTUNES, S.C.; GONÇALVES, A.M.M.; MARQUES, S.M.; GONÇALVES, S.; FERREIRA, F.; FREITAS, A.C; ROCHA-SANTOS, T.A.P.; DINIZ, M.S.; CASTRO,L.; PERES,I.; DUARTE, A.C. **The effectiveness of a**

biological treatment with *Rhizopus oryzae* and of a photo-Fenton oxidation in the mitigation of toxicity of a bleached kraft pulp mill effluent. 2009.

PELEGRINI, R.T.; BRITO-PELEGRINI, N.N. de; PATERNIANI, J.E.S.; BROTA, G.A.; SANTOS, E.M.; SILVA, N.B., Ensaio biológicos com sementes para avaliar a redução da toxicidade do chorume tratado por processo fotoquímico. 2009.

PINTAR, A; BESSON, M.; GALLETOT, P.; GIBERT, J.; MARTIN, D. Toxicity to *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri* of Kraft bleach plant effluents treated by catalytic wet-air oxidation. **Water Research**, v. 38, n. 2, p.289-300, January. 2004.

PIOTTO, Z. C. **Eco-Eficiência na Indústria de Celulose e Papel – um Estudo de Caso.** 2003. 357f. Tese (Doutorado em Engenharia Hidráulica e Sanitária) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

PIRES, E. C., CHAPARRO, T. R. Toxicity evaluation as a tool to assess the performance of an anaerobic immobilized biomass reactor. **Dyna rev.fac.nac.minas**, Medellín, v.77, n.164, p.284-391, Oct./Dec. 2010.

RADIĆ, S.; STIPANIČEV, D.; VUJČIĆ, V.; RAJČIĆ, M. M.; ŠIRAC S.; KOZLINA, B.P. The evaluation of surface and wastewater genotoxicity using the *Allium cepa* test. **Science of the Total Environment**, n. 408, p. 1228–1233, 2010.

RIZZO, L.. Bioassays as a tool for evaluating advanced oxidation processes in water and wastewater treatment. **Water Reserch**, n. 45, p.4311-4340, 2011.

ROA, O.; YEBER, M. C.; VENEGAS, W. Genotoxicity and toxicity evaluations of ECF cellulose bleaching effluents using the *Allium cepa* L. Test. **Brazilian Journal of Biology**, v. 72, n. 3, p. 471-477, 2012.

RUAS, D. B.; CHAPARRO T. R.; PIRES, Eduardo C. Processo de oxidação avançada H₂O₂/UV combinado com digestão anaeróbia para remoção de compostos organoclorados presentes em efluentes de papel e celulosa kraft. **Revista Faculdade Inglesa Universidade Antioquia**, n. 63, p.43-54, Junho, 2012.

RUDNIK, E. **Compostable Polymer Materials**. Oxford: Elsevier, p.168-180, 2008.

SALIBA, E. O. S.; RODRIGUEZ, N. M.; MORAIS, S. A. L. VELOSO, D.P. Ligninas – Métodos de Obtenção e Caracterização Química. **Ciência Rural**, v.31, n.05, p. 917-928, 2001. 1 Figura.

SARITHA, P.; APARNA, C.; HIMABINDU, V.; ANJANEYULU, Y. Comparison of various advanced oxidation processes for the degradation of 4-chloro-2 nitrophenol. **Journal of Hazardous Materials**, n. 149, p.609–614, 2007.

SAUER, T. P.; CASARIL, L.; OBERZINER, A. L.B.; JOSÉ, H. J.; MOREIRA, R. F.P.M. Advanced oxidation processes applied to tannery wastewater containing Direct Black 38—Elimination and degradation kinetics. **Journal of Hazardous Materials**, B135, p. 274–279, 2006.

TEIXEIRA, C.P.A.B.; JARDIM, W.F. **Processos Oxidativos Avançados: Conceitos teóricos**. v.3, Campinas, 2004. Disponível em: <<http://lqa.iqm.unicamp.br/cadernos/caderno3.pdf>>. Acesso em Janeiro 2008.

TORRES, L. F.; MELO R.; COLODETTE, J..L. Produção de polpa Kraft branqueada de *Pinus tecunumanii* (Eguiluz e Perry). **Sociedade de Investigações Florestais**, Viçosa, v.29, n.3, p.489-494, 2005.

USEPA: United States Environmental Protection Agency. Ecological Effects Test Guidelines. OPPTS 850.4200. Seed Germination/Root Elongation Toxicity Test. EPA 712-C-96-154, 1996. Disponível em: < <http://www.epa.gov>>. Acesso em Maio 2011.

VANHAECKE, P.; SORGELOOS, P. Hatching data on 10 commercial sources of brine shrimp cysts. Present at Proc: 12th Annual Meeting World Mariculture Soc; Seattle, March 8, 1981.

VIDAL, G.; SOTO, M.; MÉNDEZ, R.; LEMA, J. M. Influence of Bleaching Technologies on the Aerobic Biodegradability of Effluents from *Eucalyptus* Kraft Pulp Factories. **Brazilian arch. biology Technology.**, Curitiba, v.42. n.3 May 14, 1999.

YOUNG, B. J.; RIERA, N. I.; BEILY, M. E.; BRES, P. A.; CRESPO, D. C.; RONCO, A. E. Toxicity of the effluent from an anaerobic bioreactor treating cereal residues on *Lactuca sativa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, n.76, p.182-186, 2012.