

APLICAÇÃO DO PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DA TOXICIDADE (AIT - USEPA) EM AMOSTRAS DE EFLUENTES DE PROCESSAMENTO MINERAL

Giuliane Ceuli Oliveira de Medeiros

Aluna de Graduação em Ciências Biológicas 6º período,

Faculdades São José

Período PIBIC/CETEM : Janeiro de 2015 a Julho de 2015,

gmedeiros@cetem.gov.br

Silvia Gonçalves Egler

Orientadora, Bióloga, M.Sc.

segler@cetem.gov.br

Danielly de Paiva Magalhães

Co-orientadora, Bióloga, D.Sc.

dmagalhaes@cetem.gov.br

Abstract

This summary provides procedures for implementing the Toxicity Identification and Evaluation Protocol (TIE, USEPA) in the Laboratório de Ecotoxicologia Aplicado à Indústria Mínero-metalúrgica (LECOMIN). Acute toxicity tests were performed with the zooplankton *Daphnia similis*, to evaluate survival (mortality or immobility) for determining the EC50 (median effective concentration) (ABNT 12713/09). The protocol was developed in order to identify potential compound or class of compounds causing toxicity in liquid samples. The first manipulations, pH 3 and 11 adjustment test, performed with synthetic effluent did not result in reduction or removal of toxicity. Manipulations, pH 3 and 11 adjustment test, pH 3 and pH11 adjustment/filtration test, EDTA chelation test and oxidant reduction sodium thiosulfate test, carried out with fluorine mining waste resulting in increased toxicity in all thiosulfate additions tests and reducing the toxicity in pH11 adjustment test. This result indicates that the contaminant (s) causing the toxicity probably is (are) pH-dependent.

Keywords: Ecotoxicology, TIE, Effluents.

Resumo

Este resumo apresenta os procedimentos para a implantação do protocolo de Avaliação e Identificação da Toxicidade (AIT, USEPA) no Laboratório de Ecotoxicologia Aplicado à Indústria Mínero-metalúrgica (LECOMIN). Foram realizados ensaios de toxicidade aguda com o cladocero *Daphnia similis*, avaliando a sobrevivência (mortalidade ou imobilidade) para a determinação da CE50 (concentração efetiva mediana) (ABNT 12713/09). O protocolo foi elaborado de modo a identificar os possíveis compostos ou classe de compostos causadores da toxicidade em amostras líquidas. As primeiras manipulações realizadas com efluente sintético, ajuste de pH 3 e 11, não resultaram em redução ou remoção da toxicidade. Das manipulações, ajuste para pH 3 e 11, ajuste para pH 3 e pH 11 e filtração, adição de quelante EDTA e adição de oxi-redutor tiosulfato de sódio, realizadas com resíduo de bacia de decantação de mineração de flúor resultaram em aumento de toxicidade em todas as adições de

tiosulfato e redução da toxicidade no tratamento com pH11. Este resultado indica que o(s) contaminante(s) causador(es) da toxicidade provavelmente é (são) dependente(s) de pH.

Palavras chave: Ecotoxicologia, AIT, Efluentes.

1. INTRODUÇÃO

A ecotoxicologia aquática é uma sub-divisão da ecotoxicologia ambiental e tem como objetivo estimar os efeitos de substâncias naturais ou sintéticas lançadas no meio ambiente sobre os organismos, as populações e as comunidades. Contudo, mesmo que a avaliação ecotoxicológica seja uma ferramenta de grande importância, no Brasil são poucas as exigências da legislação com relação à ecotoxicidade de despejos de fontes poluidoras. As legislações vigentes que estabelecem os padrões de lançamento de efluentes e o uso de ensaios ecotoxicológicos em complemento às tradicionais análises físicas e químicas são as Resoluções CONAMA nº 357 (CONAMA, 2005) e sua complementar, a Resolução nº 430 (CONAMA, 2011).

Efluentes são constituídos de misturas e sua toxicidade pode estar relacionada a um ou mais grupos de compostos químicos como metais, amônia, compostos orgânicos, surfactantes, oxidantes, etc. A identificação desses grupos de compostos é importante para que a indústria providencie o tratamento adequado para o descarte. Para isso, foram desenvolvidos os testes de Avaliação e Identificação da Toxicidade - AIT (em inglês, *Toxicity Identification Evaluation – TIE*) que integra ferramentas de análises químicas, fracionamentos e manipulações das amostras e ensaios de toxicidade (USEPA, 1991).

A AIT consiste em submeter amostras a uma série de tratamentos físicos e químicos, de modo a reter ou eliminar grupos de compostos tóxicos (USEPA, 1991). É dividida em três etapas: a Fase I que tem como objetivo caracterizar as amostras que são submetidas a manipulações físicas ou químicas, de modo a remover, alterar ou tornar biologicamente não disponível determinado grupo de agentes tóxicos. A Fase II ou fase de identificação onde são realizadas análises químicas para identificar os agentes causadores da toxicidade de amostras complexas. A Fase III ou fase de confirmação destina-se a confirmar a identificação do agente tóxico.

2. OBJETIVOS

Implantar a Fase I do protocolo de Avaliação e Identificação da Toxicidade no Laboratório de Ecotoxicologia Aplicado à Indústria Mínero-metalúrgica (LECOMIN) e identificar os possíveis compostos ou classe de compostos causadores da toxicidade em efluentes de atividades de mineração.

3. METODOLOGIA

A toxicidade aguda das amostras foi testada com ensaios com o cladocera *Daphnia similis*. O cultivo dos organismos e metodologia dos ensaios seguiu a norma ABNT 12713/2009 (ABNT, 2009). Os ensaios tiveram duração de 24-48 horas e 10 organismos por réplica (uma a duas), com idade de 6 a 24 horas, expostos a diversas concentrações das amostras. O ensaio avalia sobrevivência (mortalidade ou imobilidade) para a determinação da CE₅₀ (concentração efetiva mediana) do efluente que causa mortalidade ou imobilidade a 50% dos organismos testados.

No Quadro 1 estão os procedimentos, objetivos e técnicas realizados na AIT.

Quadro 1: Fase I: procedimentos realizados, objetivos e técnicas (USEPA, 1991).

Dias	Procedimentos/ tratamentos	Objetivos e Métodos
Dia 1	Parâmetros físico-químicos	Estabelecer condições iniciais da amostra
	Ensaio Inicial	Verificar a toxicidade da amostra e determinar a CE_{50} Inicial do efluente em 24 h de exposição ($CE_{50i, 24h}$). Diluições nos valores de 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25% e 3,125% de efluente mais o controle negativo.
Dia 2-4	Ensaio de Referência	Avaliar a degradação da amostra ao longo do tempo (diluições iguais as do Ensaio Inicial) e servir de controle de toxicidade para avaliar a eficiência dos tratamentos na redução ou remoção da toxicidade (diluições nos valores de $4x CE_{50i, 24h}$, $2x CE_{50i, 24h}$, $1x CE_{50i, 24h}$ e $0,5x CE_{50i, 24h}$ mais o controle negativo).
	Ajuste do pH inicial para 3 e 11	Avaliar a influência do pH na solubilidade, polaridade, volatilidade, estabilidade e forma química. Diluições nos mesmos valores do Ensaio de Referência: para os dois pHs, efluente bruto e controle positivo, todos ajustados a pH 3 e 11 e controle negativo. Após tratamentos reajustar ao pH inicial para os ensaios.
	Ajuste de pH 3 e 11/Filtração	Avaliar a toxicidade associada à matéria orgânica e complexos metálicos dependentes do pH. Diluições nos mesmos valores do Ensaio de Referência para os dois tipos de pHs mais controle positivo todos ajustados a pH 3 e 11. As filtrações do efluente tratado é realizada antes dos pHs serem reajustados ao pH inicial para os ensaios.
	Adição de ácido etilendiamino tetraacético (EDTA - quelação)	Avaliar a toxicidade de metais catiônicos bivalentes. Ensaio de adição de diluição de EDTA com diluições de efluentes a $4x CE_{50i, 24h}$, $2x CE_{50i, 24h}$ e $1x CE_{50i, 24h}$ que recebem cada uma quantidades de 0,2x, 0,05x e 0,0125x da CE_{50} do EDTA para os organismos-teste.
	Adição de tiosulfato de sódio ($Na_2S_2O_3$ – oxiredução)	Avaliar a toxicidade de compostos oxidáveis (cloro e derivados, ozônio, brometos e iodetos). Ensaio de adição de diluição de tiosulfato onde são utilizadas as mesmas diluições do Ensaio com EDTA que recebem quantidades de 0,5x, 0,25x e 0,125x da CE_{50} do tiosulfato para os organismos-teste.

A redução ou não da toxicidade, como resultado dos tratamentos, é confirmada por comparação com o resultado de um ensaio com a amostra bruta (ensaio de referência), realizado concomitantemente. Deste modo, o ensaio de referência é usado como um “controle de toxicidade” dos ensaios com as amostras tratadas. Ele também permite a avaliação da toxicidade

temporal da amostra quando se compara seus resultados aos obtidos no ensaio inicial (Quadro 1).

Os controles, com água de diluição (Meio MS, ABNT, 2009), foram realizados para: a) validação dos ensaios – controle negativo (ABNT, 2009) e b) verificação de toxicidade artificial decorrente da manipulação da amostra e a qualidade (ausência de contaminação) das soluções utilizadas – controle positivo. Porém, os resultados obtidos da toxicidade dos controles positivos (água de diluição + ácido e/ou base) e dos efluentes com mesmos volumes e concentrações dos ácidos e bases adicionados não são comparáveis devido às diferentes composições de ambos. O controle positivo representa uma indicação de toxicidade se a toxicidade do efluente tratado aumentar em relação ao ensaio de referência.

A primeira amostra testada foi um efluente sintético (Efluente 1) com os seguintes metais em solução: mercúrio (mercúrio iônico - 0,01 ppm), cobre (cloreto de cobre - 1 ppm) e cádmio (cloreto de cádmio - 0,2 ppm). A segunda amostra testada foi um solubilizado de resíduo sólido de mineração de flúor, seguindo a proporção 1:6 (285 g resíduo: 1,714 L água ultrapura) (ABNT, 2004).

O programa estatístico utilizado para a obtenção das CE_{50} foi o Trimmed Spearman-Kärber Method e para comparação entre resultados o Toxstat 3,5.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As manipulações realizadas nesta fase do processo de implementação da AIT no Lecomim fazem parte de um conjunto maior de técnicas que ainda serão implantadas. Todo o conjunto de manipulações requer treinamento e este estudo representa um primeiro momento onde foi dada prioridade ao domínio de algumas destas técnicas. As outras técnicas já estão sendo estudadas. Essa metodologia vem sendo aplicada em outros países, mas no Brasil são poucos os laboratórios que começaram sua utilização. Tem se mostrado uma boa ferramenta para identificação do agente tóxico em efluentes, alertando as empresas para ações corretivas em seus tratamentos e processos de modo a atenderem a legislação.

4.1 Efluente 1:

A $CE_{50, 24h}$ do ensaio inicial para o efluente 1 foi de 16,49%, com intervalo de 95% de confiança de 14,99 e 18,15%.

Não foi observada diferença significativa entre os resultados do ensaio inicial e do ensaio de referência (ANOVA, $F = 2,1333$, $p = 0,1823$), demonstrando que o efluente manteve sua toxicidade original ao longo do tempo de realização das manipulações.

O ensaio de referência (controle da toxicidade) e as manipulações de ajuste de pH foram realizados com as seguintes diluições: 66% , 33%, 16,5% e 8,25%. Os volumes totais de soluções de ajuste utilizadas para a mudança de pH inicial para 3 e 11 e o retorno ao pH inicial (após 2 horas) adicionados ao controle positivo foram 0,61 mL de HCL (0,01; 0,1 e 1 N) e 0,66 mL de NaOH (0,01; 0,1 e 1 N).

Os tratamentos não foram significativamente diferentes do ensaio de referência (ANOVA, $F = 0,0715$, $p = 0,9314$). As manipulações realizadas não resultaram em redução ou remoção da toxicidade, ou seja, a toxicidade das concentrações dos metais utilizados para o efluente sintético não foram afetadas pela mudança de pH.

4.2 Efluente 2:

A $CE_{50, 24h}$ do ensaio inicial para o efluente 2 foi de 12,60%, com intervalo de confiança de 3,73 e 42,52%. Não foi observada diferença significativa entre os resultados do ensaio inicial e do ensaio de referência (ANOVA, $F = 1,9361$, $p = 0,1810$), demonstrando que o efluente manteve sua toxicidade original ao longo do tempo de realização das manipulações.

O ensaio de referência (controle da toxicidade) e as manipulações de ajuste de pH foram realizados com as diluições: 50%, 25%, 12,5% e 6,25%. Os volumes totais de soluções de ajuste utilizadas para a mudança de pH inicial para 3 e 11 e o retorno ao pH inicial (após 2 horas)

adicionados ao controle positivo foram 1,65 mL de HCL (0,01; 0,1 e 1 N) e 1,25 mL de NaOH (0,01; 0,1 e 1 N).

Na etapa de ajuste de pH3 e pH11, o tratamento com o pH11 foi significativamente diferente do ensaio de referência (ANOVA, $F = 5,4000$, $p = 0,0288$; teste de Tukey = 3,9490, $s = 0,0264$). A manipulação realizada resultou em redução da toxicidade, aumentando a sobrevivência dos organismos-teste. Esses resultados podem ser explicados pela presença de contaminante(s) dependente(s) de pH, tais como sulfetos, cianetos, amônia, metais e compostos orgânicos. Os tratamentos de ajuste de pH3 e pH11/filtração não foram significativamente diferentes do ensaio de referência (ANOVA, $F = 3,3380$, $p = 0,0823$).

Os tratamentos com adição de EDTA não foram significativamente diferentes do ensaio de referência (ANOVA, $F = 2,5802$, $p = 0,1262$), indicando que não houve mudanças na toxicidade nem na mortalidade dos organismos-teste.

Os tratamentos de oxi-redução com o tiosulfato de sódio foram significativamente diferentes do ensaio de referência (ANOVA, $F = 22,3056$, $p = 0,0003$). Nos resultados do teste de Dunnett realizados, a concentração de 0,46 mg/L de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ foi significativamente diferente do ensaio de referência, $t = 7,7567$, $p > 0,05$, bem como as demais adições de 0,23 mg/L, $t = 5,7155$, $p > 0,05$ e 0,116 mg/L, $t = 5,7155$, $p > 0,05$. Nestas adições ocorreu aumento da mortalidade dos organismos, ou seja, as concentrações adicionadas de tiosulfato às diluições de efluente foram tóxicas aos organismos-teste.

5. CONCLUSÕES

Apenas no tratamento com ajuste de pH para 11 foi observada redução da toxicidade aguda para o cladocera *Daphnia similis*, indicando que o(s) contaminante(s) é (são) dependente(s) de pH, tais como sulfetos, cianetos, amônia, metais e compostos orgânicos. Esses resultados serão mais bem discutidos após a caracterização química (em andamento) do solubilizado e das frações produzidas nos tratamentos.

6. AGRADECIMENTOS

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

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – NBR 10006: **Procedimento para obtenção de extrato solubilizado de resíduos sólidos**. Rio de Janeiro, RJ. 2004. 7 p.

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

CONAMA (COMISSÃO DO MEIO AMBIENTE). **Resolução 357**. 17 de março de 2005. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, DF. 2005. 27 p.

CONAMA (COMISSÃO DO MEIO AMBIENTE). **Resolução 430**. 13 de maio de 2011. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, DF. 2005. 9 p.

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