

## DETERMINAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS DE TOXICIDADE AMBIENTAL DO PERCOLADO DE UM ATERRO DE RESÍDUOS INDUSTRIAIS PERIGOSOS (ESTUDO DE CASO)

Daniela Dal Molin<sup>1</sup>, Adilson Ben da Costa<sup>2\*</sup>, Alexandre Rieger<sup>2</sup>, Daniel Pra<sup>2</sup>, Eduardo Alexis Lobo<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Curso de Química Industrial da Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC / Santa Cruz do Sul, RS, Brasil;

<sup>2</sup> Departamento de Biologia e Farmácia da Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC / Santa Cruz do Sul, RS, Brasil;

\*E-mail: [adilson@unisc.br](mailto:adilson@unisc.br)

Recebido em 25 de janeiro de 2010

Aceito em 31 de março de 2010

### RESUMO

Este estudo teve como objetivo determinar as características de toxicidade ambiental do resíduo percolado do aterro de resíduos industriais perigosos de uma central de resíduos industriais do estado do Rio Grande do Sul. As características físicas, químicas, de ecotoxicidade com *Daphnia magna* e toxicidade e mutagenicidade com *Allium cepa* foram determinadas. Os resultados indicaram características físicas e químicas dentro dos limites estabelecidos para efluentes tratados e ausência de ecotoxicidade aguda. Contudo, foi observada uma frequência significativamente aumentada de micronúcleos ( $P < 0,01$ ) na raiz em crescimento, exposta ao percolado comparado com o controle, sugerindo um efeito genotóxico deste resíduo, apesar de não apresentar alterações significativas no índice mitótico e crescimento radicular.

**Palavras-chaves:** Toxicidade ambiental, Resíduos industriais perigosos, Percolado.

### 1. INTRODUÇÃO

O crescimento populacional das sociedades de consumo vem contribuindo com a expansão do processo industrial e acarretando um aumento considerável na produção e complexidade dos resíduos sólidos industriais. Assim, devido à diversidade de substâncias potencialmente tóxicas introduzidas nos processos industriais, a destinação adequada dos resíduos sólidos é de fundamental importância para evitar o agravamento de problemas ambientais.

O Aterro de Resíduos Industriais Perigosos (ARIP) é o local correto de disposição final de resíduos potencialmente perigosos à saúde e ao meio ambiente, cuja implantação envolve fatores como a caracterização geográfica, topográfica e hidrogeológica da área, e requer um elaborado projeto de construção e operação, além da aprovação pelo órgão de controle de poluição ambiental competente.

Durante o processo de estabilização dos resíduos no ARIP, seja pela decomposição da matéria orgânica, pela umidade dos resíduos dispostos ou mesmo por infiltração da água da chuva, ocorre a formação do percolado, que se caracteriza por ser um efluente de complexa composição [1].

No monitoramento destes resíduos, a sua caracterização física, química e biológica (microbiológica), é, a bastante tempo, utilizadas como parâmetros de avaliação, como por exemplo, pela resolução no 357/2005 do CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente, que 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[2].

Contudo, o artigo 8º, § 3º, desta resolução diz que a qualidade dos ambientes aquáticos poderá ser avaliada por indicadores biológicos, quando apropriado, utilizando-se organismos e/ou comunidades aquáticas. Ainda, no mesmo artigo, § 4º, cita que as possíveis interações entre substâncias (responsáveis por efeitos sinérgicos) bem como a presença de contaminantes não listados nesta resolução, passíveis de causar danos aos seres vivos, deverão ser investigadas utilizando-se ensaios ecotoxicológicos ou toxicológicos.

No estado do Rio Grande do Sul, além da resolução nº 128/2006 do CONSEMA – Conselho Estadual do Meio Ambiente [3] que dispõe sobre a fixação de padrões de emissão de efluentes líquidos, a resolução nº 129/2006, também do CONSEMA [4], dispõe sobre a definição de critérios e padrões de emissão para toxicidade de efluentes líquidos. Esta última descreve em seu artigo 9º que os efluentes lançados não devem causar efeito tóxico agudo ou crônico a organismos-teste pertencentes a pelo menos três níveis tróficos diferentes, de acordo com a vazão de lançamento de cada empresa e tipo de efluente.

De fato, o monitoramento tradicionalmente realizado através da avaliação de parâmetros físicos e químicos deve ser complementado com o biomonitoramento. Os parâmetros biológicos fornecem informações sobre as respostas dos organismos frente a modificações ambientais. Neste sentido, vários são os autores que têm apontado para a necessidade da inclusão do monitoramento biológico para uma real avaliação da qualidade ambiental [5-7].

Estudos realizados com várias amostras de percolados apontam que estes possuem elevada toxicidade e genotoxicidade, decorrente da presença de metais pesados e de compostos orgânicos e inorgânicos tóxicos [8]. Estes agentes genotóxicos são capazes de induzir instabilidade cromossômica como, por exemplo, aberrações cromossômicas não casuais, principalmente deleções, translocações e ganho ou perda de cromossomos inteiros, contribuindo para o desenvolvimento de processos celulares malignos [9-10]. Desta forma, destaca-se a necessidade da adoção de técnicas eficientes e de baixo custo focadas na mitigação do potencial tóxico deste tipo de resíduo.

Neste contexto, o presente estudo visou determinar as características físicas e químicas do resíduo percolado do Aterro de Resíduos Industriais Perigosos (ARIP) de uma central de resíduos industriais do estado do Rio Grande do Sul e estabelecer o seu potencial de toxicidade ambiental usando ensaios de ecotoxicidade e genotoxicidade.

## 2. METODOLOGIA

### Localização da área de estudo e origem do percolado

A central de resíduos sólidos industriais em que foi desenvolvido este estudo é constituída por um aterro de resíduos industriais Classe I (ARIP), constituído por um total de 24 valas, tendo cada uma delas um volume útil de 1.138 m<sup>3</sup>, com cobertura de estrutura metálica galvanizada e telhas de alumínio, além de aterro para resíduos industriais de Classe II, e da infra-estrutura necessária para triagem e armazenamento de resíduos recicláveis.

Segundo informações da própria empresa, no ARIP são dispostos fundamentalmente materiais no estado sólido, como equipamentos de proteção individual (EPI), materiais contaminados com óleos e tintas, borras e lodos da estação de tratamento de efluentes de galvanoplastia (com teor de umidade máximo de 70%). O volume total de percolado

gerado no ARIP, em 2007, foi da ordem de 45 m<sup>3</sup>, o qual é armazenado e tratado por batelada.

### Amostragem

A amostra de percolado foi coletada na vala número 2 (única em operação), em frascos de polipropileno, os quais foram lavados, previamente, com solução desengordurante (KOH + Álcool) e com água deionizada. Os frascos foram ambientados durante a coleta, sendo lavados duas vezes com a amostra a ser analisada. Ao todo foram coletados 15 litros de amostra de percolado, resultado da acumulação em 30 dias de operação do ARIP desde o último recalque para tratamento.

As técnicas utilizadas na coleta e preservação das amostras encontram-se descritas no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* [11].

As condições ambientais nos cinco dias que antecederam a coleta foram de tempo seco. Cabe salientar que o sistema de aterros em questão conta com cobertura metálica e plástica, fechamento lateral com sombrite, sistema de drenagem de águas pluviais minimizando assim a interferência de eventos pluviométricos no volume e concentração do percolado.

### Determinações físicas e químicas

Os parâmetros físicos e químicos foram selecionados apenas para fornecer uma descrição sucinta das características das amostras do percolado bruto. Desta forma, os parâmetros determinados e suas respectivas metodologias analíticas estão descritos na Tabela 1, conforme *Standard Methods for The Examination of Water and Wastewater* [11].

Tabela 1. Parâmetros e respectivas metodologias analíticas utilizadas

Parâmetro	Unidade	Metodologia analítica
Cobre	mg L <sup>-1</sup>	Espectrometria de absorção atômica com chama
Cor aparente	uH	Colorimetria
DQO - Demanda química de oxigênio	mg L <sup>-1</sup> O <sub>2</sub>	Método Hach, digestão em refluxo fechado
Ferro	mg L <sup>-1</sup>	Espectrometria de absorção atômica com chama
Fósforo total	mg L <sup>-1</sup> (P)	Espectrometria no UV-visível, ácido ascórbico
Manganês	mg L <sup>-1</sup>	Espectrometria de absorção atômica com chama
Nitratos	mg L <sup>-1</sup> (N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	Espectrometria no UV-visível, ácido fenoldissulfônico
pH	-	Potenciometria, eletrodo de vidro
STD - Sólidos totais dissolvidos	mg L <sup>-1</sup>	Calculado a partir da condutividade elétrica
Turbidez	uT	Turbidimetria direta
Zinco	mg L <sup>-1</sup>	Espectrometria de absorção atômica com chama

### Teste de ecotoxicidade aguda com *Daphnia magna* Straus

Os testes ecotoxicológicos seguiram os procedimentos metodológicos descritos na norma da ABNT NBR 12713 (2004) [12]. Todos os testes foram realizados em duplicata, sendo utilizados 20 organismos para cada diluição (neonato, entre 2 e 26 horas de vida). Cada teste foi realizado em duplicata. Posteriormente estes foram levados a

germinadora onde permaneceram durante 48 horas, 20 ± 2°C sem exposição à luz e sem alimentação.

Após esse tempo, observou-se o número de indivíduos imóveis por concentração e a partir destes dados, calculou-se a porcentagem de imobilidade por concentração. O resultado do teste é expresso em Concentração Efetiva Inicial Mediana - CE(I)50 48h, que corresponde à concentração da amostra no início do ensaio, que causa

efeito agudo a 50% dos organismos expostos em 48 horas, nas condições de teste. A CE(I)50 48h foi calculada utilizando-se o método estatístico *Trimmed Sperman-Karber Method* [13].

### Teste de genotoxicidade com *Allium cepa* Lineu

Os testes de genotoxicidade com *Allium cepa* foram realizados conforme descrito por Fiskesjö [14, 15]. Para a execução deste teste, foram selecionados bulbos cebolas de tamanho uniforme (diâmetro variando entre 3 e 6 cm), não germinadas e saudáveis, obtidas de produtores rurais da região do Vale do Rio Pardo, Rio Grande do Sul, Brasil.

Os bulbos foram postos a germinar em tubos de ensaios com água de poço por 12 horas, em incubadora a temperatura  $20 \pm 2$  °C, no escuro. Após a germinação, estes bulbos foram transferidos para outros tubos contendo a amostra em teste e novamente levados a incubadora nas mesmas condições, onde permaneceram por 48 horas. Cada teste foi realizado com no mínimo sete réplicas.

Como amostra de controle negativo (CN) foi utilizada água de poço (in natura), e como controle positivo foi utilizado uma solução de dicromato de potássio  $1,40 \text{ mg L}^{-1}$  (CP1.4).

A avaliação da genotoxicidade foi realizada pela medição do comprimento radicular médio. Para isto, os bulbos foram retirados dos tubos de ensaio e com um paquímetro foi determinado o comprimento radicular médio por bulbo (média de 13 raízes por bulbo). Assim, as medidas das raízes do controle negativo foram comparadas com as medidas das amostras em estudo para evidenciar, principalmente, diferenças no tamanho e alterações morfológicas.

Após a determinação do comprimento radicular, as raízes foram removidas e fixadas com solução de Carnoy (metanol/ácido acético 3:1) e preservadas a 0 °C para posterior análise mutagênica, pela determinação do índice mitótico e identificação de micronúcleos. Para o ensaio de micronúcleos, as amostras previamente fixadas foram transferidas para um *becker* e lavadas com água destilada e uma solução de HCl  $1 \text{ mol L}^{-1}$ , por 10 minutos em banho-maria a 60°C. Posteriormente, o *becker* foi rapidamente resfriado em água corrente e as raízes foram lavadas em água destilada.

As raízes foram transferidas para uma lâmina, onde a coifa foi removida e o meristema apical foi cortado e macerado na presença de ácido acético 45% (m/v). Orceína acética 2 % (m/v) foi adicionada como corante e a seguir procedeu-se o squash do material.

O índice mitótico foi definido como o número de mitoses em 1.000 células contadas, identificando-se a presença de metáfase, anáfase e telófase. Da mesma forma, a presença de micronúcleos foi verificada através da observação de 1.000 células por bulbo em microscópio óptico com magnificação de 1000 vezes.

### Avaliação dos resultados

No processamento da informação, empregou-se a estatística descritiva [16]. Para identificação de correlações significativas foi aplicado o teste não paramétrico de Mann-Whitney, utilizando o programa Instat Graphpad, versão 4,02 [17].

### 3. RESULTADOS

Os resultados das determinações dos parâmetros físicos e químicos na amostra do percolado estudado, bem como os respectivos limites de emissão estabelecidos pelo Conselho Estadual do Meio Ambiente [3] apresentam-se na Tabela 2.

Tabela 2. Resultado das análises físicas e químicas e o respectivo limite estabelecido pelo Conselho Estadual do Meio Ambiente - CONSEMA (2006) para efluentes tratados.

Parâmetros	PB	Limites da resolução nº128
		do CONSEMA [3]
Cobre, $\text{mg L}^{-1}$	0,002	$0,5 \text{ mg L}^{-1}$
Cor aparente, uH	260,0	Não deve interferir na coloração do receptor.
DQO, $\text{mg L}^{-1}$	227,0	$400 \text{ mg L}^{-1}$
Ferro, $\text{mg L}^{-1}$	1,22	$10 \text{ mg L}^{-1}$
Fósforo total, $\text{mg L}^{-1}$	0,6	$4 \text{ mg L}^{-1}$
Manganês, $\text{mg L}^{-1}$	1,02	$1,0 \text{ mg L}^{-1}$
Nitratos, $\text{mg L}^{-1}$	0,6	Não especificado na resolução
Nitrogênio total, $\text{mg L}^{-1}$	7,4	$20 \text{ mg L}^{-1}$
pH	7,5	Entre 6 e 9
STD, $\text{mg L}^{-1}$	1.404,0	Não especificado na resolução
Turbidez, uT	141,0	Não especificado na resolução
Zinco, $\text{mg L}^{-1}$	0,095	$2,0 \text{ mg L}^{-1}$

Onde: PB – Percolado bruto.

Conforme os resultados obtidos, o percolado do ARIP apresentou características físicas e químicas de acordo com os parâmetros determinados pelo CONSEMA [3], para todos os parâmetros investigados, com exceção do manganês que apresentou uma concentração superior em, apenas, 2 % ao limite máximo.

Outros trabalhos indicam resultados tipicamente mais preocupantes para percolados de ARIP, por exemplo, o ARIP de Muribeca, MG, o qual apresentou uma concentração de DQO que variou de 500 a  $16.000 \text{ mg L}^{-1}$ , além de altas concentrações de metais (15 a  $220 \text{ mg L}^{-1}$  de ferro) [18].

O baixo potencial poluidor no percolado do ARIP avaliado pode ser atribuído ao fato de que no mesmo são dispostos fundamentalmente materiais no estado sólido, com baixo teor de umidade ( $\leq 70\%$ ), minimizando a formação de percolados. Além disto, cabe salientar que neste estudo não foram determinados compostos orgânicos tóxicos e metais tóxicos, o que poderiam indicar resultados diferentes.

Os resultados dos testes ecotoxicológicos com *Daphnia magna* indicaram a ausência de toxicidade aguda, quando os organismos testes foram expostos a amostra de percolado bruto por 48 horas. Ao contrário do previsto na literatura, onde valores de CE50 da ordem de 1,6 a 10,4% para percolados de aterros típicos [19].

Resultados semelhantes foram observados nos testes de crescimento radicular com *Allium cepa*. Observou-se uma inibição no crescimento radicular entre a amostra do percolado bruto (PB) e a amostra do controle negativo (CN), entretanto esta diferença não foi significativa ( $p = 0,1141$ ), como pode ser observado na Tabela 3 e na Figura 1.

Tabela 3. Resultados dos testes de toxicidade e mutagenicidade

	CR, cm	IM	MN
	Média ± DP; n	Média ± DP; n	Média ± DP; n
CN	2,38 ± 0,48; 35	4,73 ± 1,35; 11	2,55 ± 0,82; 11
CP1.4	1,62 ± 0,22; 7	7,00 ± 0,23; 4	11,55 ± 1,73; 4
PB	2,06 ± 0,48; 7	4,40 ± 0,92; 4	6,00 ± 1,15; 4

Onde: DP – desvio-padrão, n – número de replicatas, CN – amostras de controle negativo, CP1.4 – controle positivo, PB – percolado bruto, CR – crescimento radicular, IM – índice mitótico e MN – frequência de micronúcleos.

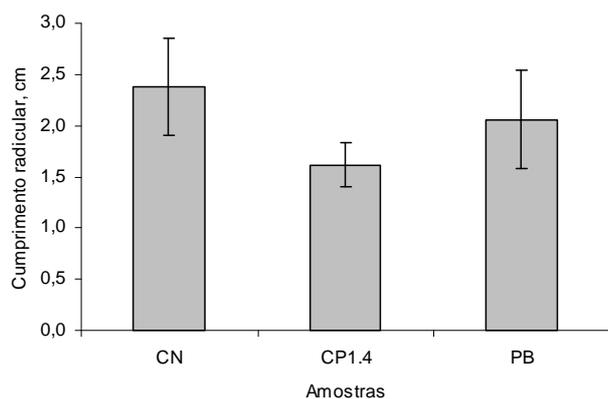


Figura 1. Resultado médio e respectivo desvio-padrão do crescimento radicular da amostra de controle negativo (CN), controle positivo (CP1.4), percolado bruto (PB)

Os resultados permitiram identificar diferenças significativas ( $P < 0,0001$ ) no crescimento radicular quando estas amostras são comparadas ao controle positivo (CP1.4), na qual se observa uma forte inibição do crescimento radicular, ocasionado pelo íons  $Cr^{6+}$ , o que comprova a eficiência da utilização do dicromato de potássio como controle positivo nos ensaios de crescimento radicular utilizados [20, 21]. Contudo não foram evidenciadas diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre o controle negativo e a amostra do resíduo avaliado (PB).

Assim como nos resultados de crescimento radicular, o índice mitótico não indicou diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre o número de células em divisão mitótica na amostra do controle negativo (CN) e na amostra do percolado bruto (PB), como pode ser observado na Figura 2.

Contudo, diferenças significativas entre o controle negativo e o controle positivo foram evidenciadas ( $P < 0,001$ ). Desta forma, ao comparar os resultados de

crescimento radicular e índice mitótico, verifica-se que um aumento da quantidade de células em divisão no controle positivo não resulta em um maior crescimento radicular.

Geralmente a inibição do crescimento radicular reflete uma redução da atividade mitótica, que pode ocorrer devido à inibição da síntese do DNA ou ao bloqueio da fase G2 do ciclo celular, impedindo a mitose na célula. Entretanto, Mitteregger-Júnior et al. (2006) também descreve resultados inversamente proporcionais entre estas duas variáveis [22].

Estes resultados sugerem que um aumento da atividade mitótica em ambientes citotóxicos pode resultar em um crescimento anômalo da raiz, alterando outras propriedades que não o seu comprimento, ou mesmo gerando células não viáveis.

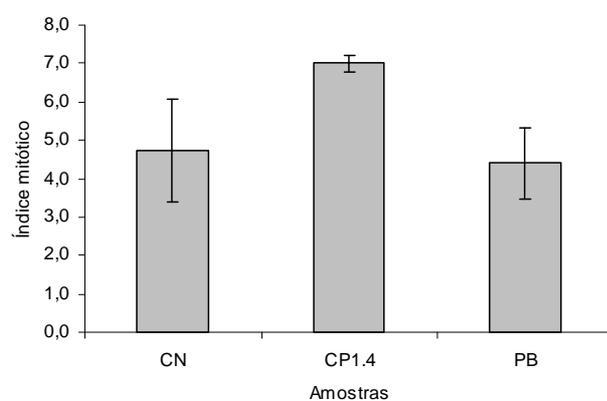


Figura 2. Resultado médio e respectivo desvio-padrão do índice mitótico nos ensaios com as amostras de controle negativo (CN), controle positivo (CP1.4) e percolado bruto (PB)

Os ensaios para identificação de micronúcleos foram os mais eficazes no diagnóstico da toxicidade ambiental do percolado (Figura 3), identificando um aumento significativo ( $P < 0,01$ ) na frequência de micronúcleos na amostra do percolado bruto (PB), em comparação ao controle negativo (CN).

A Figura 4 apresenta exemplos dos micronúcleos observados neste estudo.

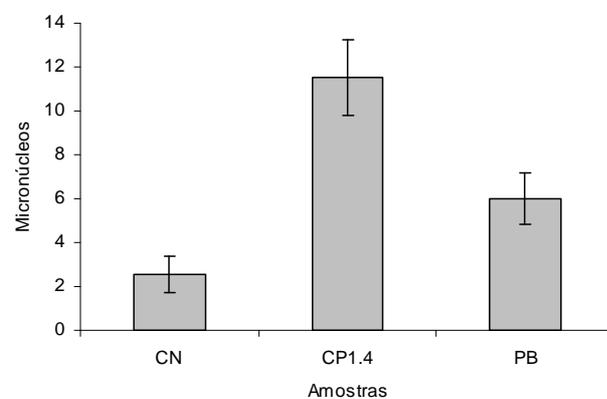


Figura 3. Resultado médio e respectivo desvio-padrão da frequência de micronúcleos nos ensaios com as amostras de controle negativo (CN), controle positivo (CP1.4) e percolado bruto (PB)

É importante notar que os resultados dos testes ecotoxicológicos com *Daphnia magna*, assim como os ensaios de crescimento radicular e índice mitótico pouco contribuíram para a identificação da toxicidade do percolato do ARIP. Entretanto, a genotoxicidade foi identificada claramente na quantificação de micronúcleos.

#### 4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo descrevem um baixo potencial poluidor do percolato do ARIP em questão, quando comparado com outros aterros ou mesmo em função do material nele depositado.

Contudo, apesar dos ensaios ecotoxicológicos com *Daphnia magna* e de toxicidade através do crescimento

radicular com *Allium cepa* não indicarem toxicidade aguda do resíduo avaliado, os testes de genotoxicidade, também com *Allium cepa*, indicaram a presença de micronúcleos em quantidade significativamente superior à encontrada no controle negativo, sugerindo um potencial genotóxico para o resíduo avaliado.

Cabe salientar que os ensaios com *Daphnia magna* foram testes de efeito agudo como preconiza a resolução n° 129/2006 do CONSEMA [4] e que embora não se tenha trabalhado com outros níveis tróficos como orienta esta resolução, os resultados mostram a importância no desenvolvimento de estudos de ecotoxicidade crônica, bem como a adoção de ensaios de genotoxicidade como o empregado neste trabalho na avaliação do impacto ambiental de resíduos deste tipo.

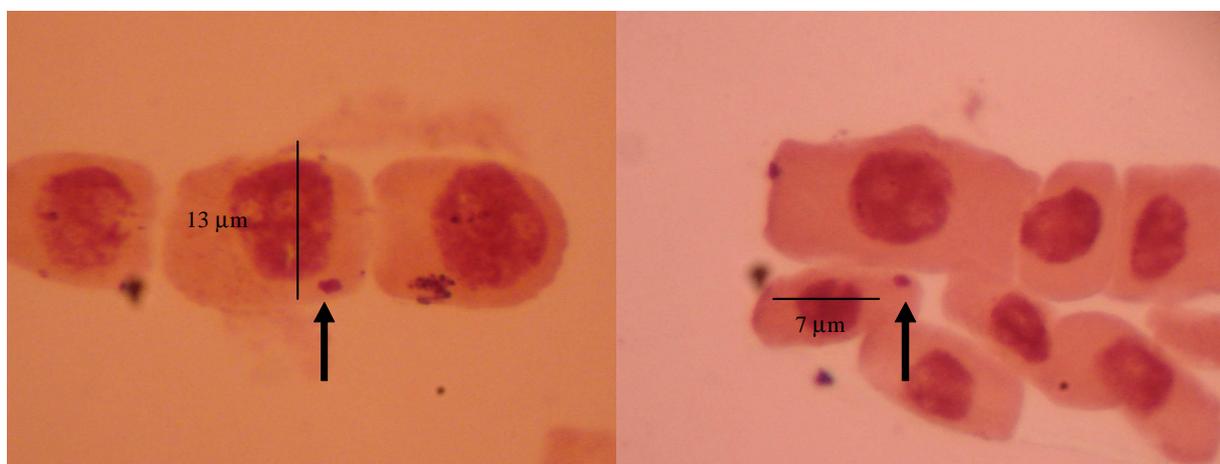


Figura 4. Micronúcleos identificados nas amostras de percolato bruto

#### 5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao às biólogas Vanessa Dalla Colletta e Clara Forrer Charlier pela colaboração na realização dos ensaios laboratoriais e ao Curso de Química Industrial da UNISC por financiar esta pesquisa.

#### DETERMINATIONS OF THE ENVIRONMENTAL TOXICITY CHARACTERISTICS OF THE LANDFILL LEACHATE FROM A HAZARDOUS INDUSTRIAL WASTE CENTER (CASE STUDY)

**ABSTRACT** - The aim of this study was to evaluate the environmental toxicity of the landfill leachate of a hazardous industrial solid waste center from the Rio Grande do Sul state, Brazil. The physical and chemical characteristics, as well as the ecotoxicity with *Daphnia magna* and toxicity and mutagenicity with *Allium cepa* were determined. The results of the row leachate sample indicated that the physical and chemical characteristics are compatible with the limit values imputed for treated wastewaters by local governmental agencies. Although there was absence of acute ecotoxicity, a significantly greater ( $P < 0.01$ ) frequency of micronuclei was verified in

relation to negative control, suggesting a genotoxic effect of this waste. However, no significant alterations in the mitotic index and root growth were observed.

#### 7. REFERÊNCIAS

- [1] ROCCA, A. C. C. Resíduos Sólidos Industriais. São Paulo: CETESB, 233p, 1993.
- [2] CONAMA - CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução n.º 357, de 17 de março de 2005. Ministério do Desenvolvimento Urbano e Meio Ambiente. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 18 de março de 2005.
- [3] CONSEMA - CONSELHO ESTADUAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução n.º 128, de 24 de novembro de 2006. Secretaria do Meio Ambiente do Estado do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.
- [4] CONSEMA - CONSELHO ESTADUAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução n.º 129, de 24 de novembro de 2006. Secretaria do Meio Ambiente do Estado do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.
- [5] BRENTANO, D. M. & LOBO, E. A. Revista Brasileira de Toxicologia. v. 17, n. 2, p. 13-18. 2004.
- [6] LOBO, E. A.; RATHKE, F.S.; BRENTANO, D. M. Ecotoxicologia aplicada: o caso dos produtores de tabaco na bacia hidrográfica do Rio Pardinho, RS, Brasil. p. 41-68. In: Etges, V. E.; Ferreira, M. A. F. A produção do tabaco: impacto no ecossistema e na saúde humana na região de Santa Cruz do Sul/RS. Santa Cruz do Sul: EDUNISC, 2006. 248p.
- [7] FENT, K. Toxicology Letters, v.140, p. 353-365. 2003.

- [8] SISINNO, C. L. S. Destino dos resíduos sólidos urbanos e industriais no estado do rio de janeiro: avaliação da toxicidade dos resíduos e suas implicações para o ambiente e para a saúde humana. Tese (Fundação Oswaldo Cruz Escola Nacional de Saúde Pública) Rio de Janeiro, 2002.
- [9] CAVANEE, W. K.; DRYJA, T. P.; PHILLIPS, R. A.; BENEDICT, W. F.; GOBOUT, R.; GALLIC, B. L.; MURPHEE, A. L.; STRONG, L. C.; WHITE, R. L. *Nature*, 305:779-784, 1983.
- [10] ROWLEY, J. D. *Cancer Research*, 44:3159-3161, 1984.
- [11] APHA - AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION; AWWA - AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION; WEF - WATER ENVIRONMENTAL FEDERATION. *Standard Methods for The Examination of Water and Wastewater*. 19<sup>a</sup> ed. Washington, 1.223p., 2005.
- [12] ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 12.713: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia* spp. (Cladocera, Crustacea). Rio de Janeiro, 16 p., 2004.
- [13] HAMILTON, M. A.; RUSSO, R. C.; THURSTON, R. V. Burlington research inc. *fei. Tecnol.* v. 7, n. 11, 114-119. 1979
- [14] FISKESJO, G., The Allium test – a potential standard for the assessment of environmental toxicity. In: J. W. Gorsuch (ed.), ASTM (American Society of testing Materials) special technical publication 1216. *Environ. Toxicol. Risk Assessment.*, 331-345, 1993.
- [15] FISKEJÖ, G. *An International Journal* 9: 235-241, 1994.
- [16] ZAR, J. H. *Biostatistical Analysis*. Third Edition. Prentice-Hall International, INC: USA. 1996.
- [17] SPIEGEL, M.R. *Probabilidade e Estatística*. São Paulo: McGraw-Hill do Brasil, 1978.
- [18] OLIVEIRA, F. J. S.; JUCÁ, J. F. T. *Engenharia sanitária ambiental*, v 9, n. 3, 211-217, 2004.
- [19] CARNIATO, J.G., GERALDO, S.M., PELEGRINI, N.N.B, PATERNIANI, J.E.S., PELEGRINI, R.T. *Engenharia Ambiental – Espírito Santo do Pinhal*, v. 4, n. 2, 92 -101, 2007.
- [20] LIU, DH, JIANG, WS, LI MX. *Hereditas*, 117, 23-29, 1992.
- [21] MITTEREGGER-JÚNIOR, H., FERRAZ-DIAS, J., LÚCIA-YONEMA, M., ARENZON, A., SILVA, J., PEGAS- HENRIQUES, J. A. *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.*, v. 1, n. 2, 147-151, 2006.
- [22] SILVA, D.S.B.S., GARCIA, A.C.F.S., MENDES, S.S., MATA, S.S., RIBEIRO, S.O.; PANTALEÃO, S.M. Avaliação de citotoxicidade e crescimento radicular de mulungu no sistema *Allium cepa*. In: 54<sup>o</sup> Congresso Brasileiro de Genética, Salvador, BA, 151, 2008.