

CARLA KEITE MACHADO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TOXICOLÓGICO AMBIENTAL DE EFLUENTES  
RESULTANTES DE TRATAMENTOS POR HEMODIÁLISE**

JOINVILLE

2013

CARLA KEITE MACHADO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TOXICOLÓGICO AMBIENTAL DE EFLUENTES  
RESULTANTES DE TRATAMENTOS POR HEMODIÁLISE**

Dissertação de Mestrado como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Saúde e Meio Ambiente, na Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE.  
Orientador (a): Prof. Dr. Gilmar Sidnei Erzinger

**JOINVILLE**

**2013**

Termo de Aprovação

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TOXICOLÓGICO AMBIENTAL DE EFLUENTES  
RESULTANTES DE TRATAMENTOS POR HEMODIÁLISE**

por

Carla Keite Machado

Dissertação julgada para obtenção do título de Mestre em Saúde e Meio Ambiente, área de concentração Biotecnologia, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Mestrado em Saúde e Meio Ambiente, da Universidade da Região de Joinville.

---

Professor PHD. Gilmar Sidnei Erzinger  
Orientador (UNIVILLE)

---

Professora Professor PHD. Gilmar Sidnei Erzinger  
Coordenador do Programa de Mestrado em Saúde e Meio Ambiente, da Universidade da Região de Joinville.

Banca Examinadora

---

Profº. PHD. Gilmar Sidnei Erzinger  
Orientador (UNIVILLE)

---

Profº. Dr Adriano Weider Cacciatori Marenzi  
(UNIVALI)

---

Profª. Drª Noeli Sellin  
(UNIVILLE)

Joinville, 28 de fevereiro de 2013

Dedico este estudo *in memória* ao meu amado pai, Adgonal Machado, que seu último ensinamento para mim foi: “Minha filha faça o que você gosta de fazer, é estudar, estude!” Ao meu esposo, André de Bitencourt Machado, e minha filha Amábile Bitencourt Machado, que nossos empreendimentos sejam sempre alicerçados em estudo, trabalho, ação e progressão.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus.

Aos meus pais, *in memória* Glória de Miranda Machado e Adgonal Machado, que me educaram a ter o caráter honesto, generoso e trabalhador, fundamental na minha vida.

Ao meu amado esposo André de Bitencourt Machado, e minha amada filha Amábile Bitencourt Machado, que me causam muita alegria e me surpreendem a cada dia.

À Universidade da Região de Joinville - Univille, por vivenciar os experimentos e ao cumprimento profissional como Bióloga, disseminando o conhecimento e contribuindo para a evolução da comunidade acadêmica.

Ao Professor PHD. Gilmar Sidnei Erzinger, sou profundamente grata ao me aceitar como orientanda no Mestrado em Saúde e Meio Ambiente, da Universidade da Região de Joinville.

Ao Professor Bentólogo Dr. Luciano Lorenzi Chefe do Departamento de Biologia, Ao Professor Botânico Dr. João Carlos de Melo Jr. vice-chefe do Departamento de Biologia, da Universidade da Região de Joinville, e ao Engenheiro Agrônomo e Chefe da Área de Laboratórios Rogério Francisco dos Passos, meus estimados chefes que sempre estão dispostos a ajudar e contribuíram para mais esta conquista o título em Mestre em Saúde e Meio Ambiente.

À Graduanda em Engenharia Química Cláudia Correia Hack, técnica do Laboratório de Meio Ambiente, da Universidade da Região de Joinville, a qual sou grata profundamente, pois colaborou muito com os experimentos realizados com as *Daphnias*.

Ao assistente dos laboratórios Darlei Roberto Pandini e a técnica dos laboratórios de práticas do ensino e Engenheira Ambiental Aline Scheller, ambos da Universidade da Região de Joinville, pela prestatividade e colaboração em todo momento.

Ao Mestrando em Zoologia pela Universidade Federal do Paraná, Luiz Paulo da Silva, pelos ensinamentos em vários softwares.

A Bacharel em Direito Advogada Gizely Corsani, Professora de Língua Portuguesa Sandra Regina Ricardo Machado, e a Bióloga e Especialista em Gestão Ambiental Jeniffer Passarela Menegáz, pela colaboração em ler, questionar e as sugerir algumas correções em minha dissertação.

A todos que diretamente ou indiretamente estiveram envolvidos na execução desta dissertação.

"Até quando Deus parecia ter me abandonado, Ele estava me vigiando. Mesmo quando Ele parecia indiferente ao meu sofrimento, estava vigiando. E quando eu perdi toda a esperança de ser salvo, Ele me deu descanso, me deu um sinal para eu continuar a jornada."

Do filme: As aventuras de Pi

## SUMÁRIO

**RESUMO**

**ABSTRACT**

**LISTA DE TABELAS**

**LISTA DE FIGURAS**

**LISTA DE SIGLAS**

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>1.1 OBJETIVOS</b> .....	19
1.1.1 Objetivo Geral .....	19
1.1.2 Objetivos Específicos .....	19
<b>2 REVISÃO</b> .....	20
2.1 Processo de hemodiálise .....	20
2.2 Histórico do tratamento de hemodiálise no Brasil .....	22
2.3 Histórico da hemodiálise em Santa Catarina.....	23
2.4 Legislação vigente sobre o destino final do efluente resultante de hemodiálise .....	25
2.5 Características físico-químicas do efluente gerado na hemodiálise.....	26
2.6 Consequências geradas pelo lançamento de efluentes oriundos dos tratamentos de hemodiálise nos ambientes aquáticos.....	27
2.7 Baía Babitonga e sua relação com águas residuais de Joinville .....	28
2.8 Histórico do tratamento de esgoto na cidade de Joinville.....	29
2.9 Ecotoxicidade .....	31
2.9.1 Conceito .....	31
2.10 Testes de ecotoxicidade.....	36
2.11 <i>Euglena gracilis</i> .....	38
2.12 Ferramenta de monitoramento ambiental – NGTOX.....	39
2.13 <i>Vibrio fischeri</i> .....	42



2.14 Ferramenta de monitoramento ambiental - Microtox® .....	43
2.15 <i>Daphnia magna</i> .....	44
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	<b>45</b>
3.1 Coleta da amostragem .....	45
3.2 Caracterização físico-química do efluente resultante da hemodiálise .....	45
3.3 Fitoplâncton e Manutenção .....	46
3.4 Análises de toxicologia ambiental através do NGTOX .....	46
3.4.1 Princípio de medição .....	48
3.4.2 Os parâmetros de movimento e de forma .....	48
3.5 Teste de atividade aguda para <i>Euglena gracilis</i> utilizando o NGTOX .....	53
3.7 Metodologia de teste agudo <i>Daphnia magna</i> .....	54
3.8 Determinação da toxicidade crônica de <i>Daphnia magna</i> .....	55
3.9 Parâmetros analisados durante o teste crônico .....	56
3.10 Teste de inibição da emissão da luminiscência em <i>Vibrio fischeri</i> .....	58
3.11 Método de bioensaios de toxicidade aguda com bactérias luminescentes <i>Vibrio fischeri</i> .....	59
3.12 Análises estatísticas .....	60
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>61</b>
4.1 Caracterização da amostra .....	61
4.2 Avaliação da toxicidade ambiental aguda .....	63
4.2.1 Sensibilidade dos organismos-teste .....	63
4.3 Testes crônicos .....	68
<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>75</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>76</b>

## RESUMO

A água é um tema abordado em âmbito mundial, processos de racionalização e reutilização são essenciais para a conservação e economia. Joinville reflete a maioria das cidades do Brasil, aproximadamente 16,4% de efluentes domésticos são tratados. Os hospitais e clínicas estão localizados em áreas que não possuem a captação destes efluentes pela rede coletora pública de tratamento de esgoto. Os efluentes gerados são lançados *in natura*, destinados a Baía da Babitonga. Este estudo caracterizou quimicamente e fisicamente o efluente gerado durante o processo de hemodiálise e avaliou o seu potencial toxicológico ambiental. Um centro de hemodiálise em Joinville, foi escolhido ao acaso, coletaram-se quatro amostras em dias diferentes, resultantes de 56 pacientes. As análises químicas foram realizadas pelo método colorimétrico, mensurando: nitrito, nitrato, fosfato, sílica e sulfato. As análises de Demanda Química Oxigênio (DQO) e Demanda Bioquímica Oxigênio (DBO<sub>(5,20)</sub>) seguiram as metodologias da Standard Methods, 1998. As análises físicas foram realizadas no multiparâmetros F-HI9828, Hanna Instruments, mensurando: pH, condutividade, salinidade, turbidez, dureza, oxigênio dissolvido e temperatura. Os resultados das análises físico/químicas foram relacionados com a Resolução do CONAMA 430 (2011). Para os testes ecotoxicológicos os resultados foram comparados na Portaria do FATMA 017/2002, para este os organismos definidos foram dois: 1) *Daphnia magna* cultivada segundo a ISO 6341 (2012). Os testes agudos seguiram a NBR 12.713 (ABNT, 2003). Os testes de toxicidade crônica seguiram a ISO 10706 (2000). Na determinação da concentração de efeito não observado (CENO) e na concentração de efeito observado (CEO) foram comparadas diferentes tratamentos pelo teste de Kruskal-Wallis. 2) *Vibrio fisheri* conforme CETESB L5.227(2001). *Euglenas gracilis* cultivadas no meio de cultura mineral orgânico em condições descritas por Checcucci *et al.* (1976). Os testes de ecotoxicidade agudo realizados no New Generation Ecotox (NGTOX). Através do software *ImagingTox*, determinou-se os valores de: motilidade, orientação gravitacional, velocidade e forma. O efluente apresentou valores superiores para: nitrito, fosfato, nitrogênio total, condutividade, turbidez, DBO e DQO, comparado a legislação vigente. O grau de toxicidade agudo para a *Daphnia magna* foi de 7,74 FDd valor superior a legislação preconizada. No teste crônico determinou o CENO (3,70% FDd) e o CEO (18,75% FDd) sem efeito estatisticamente significativo. Para *Vibrio fisheri* foi 1 FDd dentro do valor preconizado na legislação. Os testes de toxicidade aguda para a *Euglena gracilis* resultaram na gravitaxia negativa, indicando-o tóxico.

**Palavras-chaves:** efluentes de hemodiálise, *Daphnia magna*, *Euglena gracilis*, *Vibrio fisheri*, toxicidade ambiental.

## ABSTRACT

Water is an issue addressed worldwide, streamlining processes and reuse are essential for the conservation and economics. Joinville reflects most cities in Brazil, about 16,4% of domestic effluents are treated. Hospitals and clinics are located in areas that do not have the funding for these effluent collection network public sewage treatment. The effluents are released *in nature*, aimed at Babitonga Bay. This study characterized chemically and physically effluents generated during the hemodialysis process and evaluate their potential environmental toxicology. A hemodialysis center in Joinville, was chosen at random, four samples were collected on different days, resulting in 56 patients. Chemical analyzes were by the colorimetric method, measuring: nitrite, nitrate, phosphate, silica, and sulfate. Analysis of Chemical Oxygen Demand (COD) and Biochemical Oxygen Demand (BOD<sub>(5,20)</sub>) followed the methodology of Standard Methods, 1998. The analyzes were performed at the physical multiparameter F-HI9828, Hanna Instruments, measuring pH, conductivity, salinity, turbidity, hardness, dissolved oxygen and temperature. The results on the physical / chemical were related CONAMA Resolution 430 (2011). For ecotoxicological tests results were compared in the FATMA Ordinance 017/2002, for the two organisms were defined: 1) *Daphnia magna* grown according to ISO 6341 (2012). The acute tests followed the NBR 12.713 (ABNT, 2003). Chronic toxicity tests to ISO 10706 (2000). In determining the concentration of the effect not observed (NOEC) and the observed effect concentration (CEO) different treatments were compared by Kruskal-Wallis. 2) *Vibrio fischeri* as Cetesb L5.227 (2001). *Euglena gracilis* grown in culture medium mineral organic conditions described by Checcucci *et al.* (1976). The acute ecotoxicity tests performed at the New Generation ECOTOX (NGTOX). Through software ImagingTox, determined the values of: motility, gravitational orientation, velocity and shape. The effluent showed higher values for: nitrite, phosphate, total nitrogen, conductivity, turbidity, BOD and COD, compared to current law. The degree of acute toxicity to *Daphnia magna* was 7.74 FDd value greater than legislation proposed. Test determined the chronic NOEC (3.70% FDd) and CEO (18,75% (FDd) with no statistically significant effect. *Vibrio fischeri* For FDbl 1 was within the level set in the legislation. Tests for acute toxicity to *Euglena gracilis* resulted in gravitaxia negative, indicating it toxic.

**Keywords:** dialysis effluent, *Daphnia magna*, *Euglena gracilis*, *Vibrio fischeri*, environmental toxicity.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Classe 3 padrão de água doce após 2001.....	33
<b>Tabela 2.</b> A comparação entre o sistema (NGTOX) New Generation Ecotox e o teste Microtox®. ....	41
<b>Tabela 3.</b> Resultados da caracterização físico-química dos efluentes resultantes de hemodiálise. A média foi obtida de quatro amostras diferentes obtidas em diferentes dias. ....	62
<b>Tabela 4.</b> Resultados médios das inibições percentuais e do valor de CL50 dos testes agudos obtidos com a alga <i>Euglena gracilis</i> . ....	65
<b>Tabela 5.</b> Número médio de filhotes por dia (média) de <i>Daphnia magna</i> expostos a diferentes concentrações % de efluentes de hemodiálises. Cada ponto corresponde a dez <i>Daphnias magna</i> . ....	69

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Distribuição do tratamento de esgoto da cidade de Joinville.....	31
<b>Figura 2.</b> Anatomia da fêmea: 1- coração, 2- olho composto, 3- antenas, 4- ocellus, 5- pelos, 6- pernas e 7- bolsa para ovos (A) e exemplar de <i>Daphnia</i> sp. (B). .....	44
<b>Figura 3.</b> Esquema demonstrativo do Instrumento NGTOX. ....	47
<b>Figura 4.</b> Modelagem matemática para Cálculo do vetor de movimento da célula de <i>Euglena gracilis</i> .....	49
<b>Figura 5.</b> Medida do comprimento total de <i>Daphnia magna</i> . ....	57
<b>Figura 6.</b> Bactéria <i>Vibrio fischeri</i> .....	58
<b>Figura 7.</b> Número de filhotes por dia (média) das <i>Daphnia</i> spp. exposto a diferentes concentrações % de efluentes de hemodiálises. CE50 = 7,72 ± 3,46 diluição, p =<0,0001. ....	64
<b>Figura 8.</b> Inibição percentual da mortalidade da <i>Euglenas gracilis</i> exposto a diferentes concentrações % de efluentes de hemodiálises. CE50 = 4,36, ± 20,76 diluição, p =<0,0001. ....	66
<b>Figura 9.</b> Inibição percentual do alinhamento de <i>Euglenas gracilis</i> exposto a diferentes concentrações % de efluentes de hemodiálises. CE50 = 2,97, ± 7,90 diluição, p =<0,0001. ....	66
<b>Figura 10.</b> Inibição percentual da compacidade da <i>Euglena gracilis</i> exposto a diferentes concentrações % de efluentes de hemodiálises. CE50 = 1,59, ± 9,81 diluição, p =<0,0001. ....	67
<b>Figura 11.</b> Inibição percentual do r-value da <i>Euglena gracilis</i> exposto a diferentes concentrações % de efluentes de hemodiálises. CE50 = 10,56, ± 15,83 diluição, p =<0,0001. ....	67
<b>Figura 12.</b> Inibição percentual movimento ascendente da <i>Euglena gracilis</i> exposto a diferentes concentrações % de efluentes de hemodiálises. CE50 = 3,48, ± 13,00 diluição, p =<0,0001. ....	67
<b>Figura 13.</b> <i>Daphnia magna</i> – Controle – Réplica 1 .....	69
<b>Figura 14.</b> <i>Daphnia magna</i> – Diluição 1% – Réplica 1.....	70
<b>Figura 15.</b> <i>Daphnia magna</i> – Diluição 5% – Réplica 4.....	70
<b>Figura 16.</b> <i>Daphnia magna</i> – Diluição 10% – Réplica 3.....	71

<b>Figura 17.</b> <i>Daphnia magna</i> – Diluição 10% – Réplica 9.....	71
<b>Figura 18.</b> Relações alométricas entre o tamanho ventral e o dorsal das <i>Daphnias magna</i> ao final dos experimentos do controle, 1, 5 e 10%. $R^2 = 0,9317$ , $Y = 0,717698x + 0,5250$ . .....	72
<b>Figura 19.</b> Avaliação do crescimento final das <i>Daphnias magna</i> exposto a diferentes concentrações % de efluentes de hemodiálises. Cada ponto corresponde a dez <i>Daphnia magna</i> . .....	73
<b>Figura 20.</b> Número de filhotes por dia (média) das <i>Daphnia</i> spp. exposto a diferentes concentrações % de efluentes de hemodiálises. Cada ponto corresponde a dez <i>Daphnias magna</i> .....	74
<b>Figura 21.</b> Número de filhotes por dia (média) das <i>Daphnias magna</i> exposto a diferentes concentrações % de efluentes de hemodiálises. ....	74

## LISTA DE ABREVIATURAS

NGTOX - New Generation Ecotox  
HD – Hemodiálise  
DP - Diálise Peritoneal  
UF – Ultrafiltração  
PTM - Gradiente de Pressão Transmembrana  
DRC - Doença Renal Crônica  
USRD - United States Renal Data System  
SBN - Sociedade Brasileira de Nefrologia  
DRET - Doença Renal em Estágio Terminal  
Pmp - Pacientes em diálise por milhão da população  
IRC - Insuficiência Renal Crônica  
TRS - Terapia Renal Substitutiva  
SUS - Sistema Único de Saúde  
EAS - Estabelecimento Assistencial de Saúde  
FT - Fator de Toxicidade  
CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente  
RDC - Resolução da Diretoria do Colegiado  
CECR - Concentração do Efluente no Corpo Receptor  
CENO – Concentração de Efeito não Observada  
CEO – Concentração de Efeito Observada  
DBO - Demanda Bioquímica de Oxigênio  
ISO - International Organization for Standardization  
CETESB - Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo  
ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas  
DL<sub>50</sub> – Dose Letal  
CL<sub>50</sub> – Concentração Letal  
CE50 – Concentração de Efeito a 50%  
Rubisco - Ribulose-bisfosfato carboxilase oxigenase  
CCD - Charged Coupled Device

## 1 INTRODUÇÃO

A água é um recurso essencial para a manutenção e equilíbrio da vida, um bem inestimável para os pacientes renais crônicos que realizam hemodiálise. A água destinada ao processo de hemodiálise deverá ser rigorosamente tratada, pois a qualidade desta água pode comprometer o tratamento clínico. O mínimo de contaminação na água, por substâncias orgânicas ou inorgânicas, pode provocar enfermidades aos pacientes e causar insegurança para o corpo técnico que atua nesta especialidade médica (PEGORARO, 2005).

Anteriormente, o foco das clínicas de hemodiálise, visava à produção de água com qualidade garantindo a segurança para o paciente durante seu tratamento. Experimentos foram realizados, até mesmo confiando que era possível empregar água potável no processo da hemodiálise. Não obtendo bom êxito nos experimentos, novas técnicas foram testadas sem sucesso. Outras técnicas de tratamento foram atribuídas, e se consolidou o emprego do processo da osmose reversa (SANCHES, 2008).

Dominado o processo, o tratamento de hemodiálise nos pacientes renais, proporcionou a segurança para o paciente e para o corpo médico. Mesmo assim, este tratamento ocasiona um desperdício de água expressivo e um elevado índice de efluente é lançado no meio ambiente. Como indicador, durante o período de um mês de tratamento de 10 a 12 sessões de hemodiálise em um paciente com insuficiência renal, são descartados aproximadamente 1200 litros de água pelo processo de rejeição da membrana filtrante. Pois, em média, cada minuto de um tratamento de hemodiálise descarta 500 mL de água. Uma sessão de hemodiálise pode durar de 4 a 6 horas. Dependendo do número de pacientes em tratamento, uma clínica de hemodiálise chega a lançar 8000 litros de efluente na rede pública de esgotamento sanitário, por dia. A água é um tema visado e abordado em âmbito mundial, empregar recursos que promovam a racionalização e reutilização deste recurso natural, desprezado diariamente em clínica de hemodiálise, torna-se um progresso social e econômico de preservação do meio ambiente (MARTINS, 2005).

O risco que um agente químico impõe ao ambiente aquático é avaliado pelo julgamento científico da probabilidade dos danos que suas concentrações



ambientais conhecidas, ou estimadas, podem causar. Nessa perspectiva, o conceito de segurança passa a ser entendido como julgamento ponderado da aceitabilidade do risco, ou seja, o agente químico será considerado seguro se seus riscos forem julgados aceitáveis (CAIRNS *et al*, 1980).

A toxicologia aquática, como descrevem Magalhães e Ferrão Filho (2008), “é uma ciência que surgiu para dar suporte no enfrentamento dos problemas de contaminação dos corpos d’água por compostos tóxicos”. A toxicidade de agentes químicos no meio hídrico é avaliada por meio de testes toxicológicos utilizando organismos representativos da coluna d’água ou do sedimento, seja de água doce, salobra ou marinha. O conhecimento da toxicidade desses compostos tóxicos a diferentes organismos aquáticos possibilita avaliar o impacto momentâneo que esses poluentes causam à biota aquática (ZAGATTO, 2008).

Segundo Magalhães e Ferrão Filho (2008), a toxicologia é uma ferramenta que pode ser utilizada antes ou após um evento de contaminação ter ocorrido, e Azevedo e Chasin (2003) complementam que tal ciência deve ser utilizada para prognosticar a ecotoxicidade de novos compostos químicos, evitando assim a contaminação ambiental, onde se estabelece o foco do presente trabalho.

A aplicação dos testes de toxicidade na análise ambiental é bastante abrangente e sua importância aumenta na proporção que cresce a complexidade das transformações químicas no meio ambiente, pois somente os sistemas biológicos podem detectar os efeitos tóxicos das substâncias (MAGALHÃES e FERRÃO FILHO, 2008).

O efluente do tratamento de diálise contém quantidades apreciáveis de sódio potássio, nitrogênio e a presença de hipoclorito de sódio qual é utilizado para a desinfecção da máquina de diálise (SANCHES, 2008).

A deficiência dos processos de tratamento de esgoto coloca em evidência, também a dificuldade na inibição e remoção de microrganismos, bactérias patogênicas resistentes aos antibióticos provenientes da diálise. Em muitos países em emergência, como no Brasil, os esgotos e efluentes dos hospitais são frequentemente despejados diretamente nos cursos d’água sem qualquer tratamento anterior (EMMANUEL, 2005).

Frente a esse cenário a cidade de Joinville reflete a situação da maioria das cidade do Brasil. Onde apenas cerca de 16,4% de seu efluentes domésticos são tratados e as unidades hospitalares e clínicas estão localizadas em áreas, que não possuem a captação destes efluentes pelo sistema público, sendo que todos os dejetos produzidos são jogados *in natura* e tem como destino final a Baía da Babitonga se faz necessário o estudo para avaliar o potencial toxicológico ambiental dos efluentes gerados pelas hemodiálises.

## **1.1 OBJETIVOS**

### **1.1.1 Objetivo Geral**

Avaliar o impacto toxicológico ambiental dos efluentes resultantes dos pacientes que realizam o tratamento de hemodiálise, sobre diferentes bioindicadores quando descartados diretamente no meio ambiente.

### **1.1.2 Objetivos Específicos**

- Caracterizar a composição físico e química do efluente coletado da máquina de diálise durante o processo de hemodiálise;
- Determinar e Avaliar o grau de toxicidade ambiental agudo e crônico através de diferentes bioindicadores;

## 2 REVISÃO

### 2.1 Processo de hemodiálise

A hemodiálise (HD) é um método de terapia de substituição da função renal caracterizado pela circulação extracorpórea de sangue do paciente para ser filtrado e depurado. Os objetivos da hemodiálise constituem na extração de toxinas nitrogenadas do sangue e remoção do volume excessivo de água utilizando-se de alguns elementos. O sangue, contendo as toxinas e resíduos nitrogenados, é desviado do paciente para um aparelho, o dialisador, onde é limpo e, em seguida devolvido ao paciente (Manual de Diálise, 2012).

A hemodiálise é um processo que filtra e depura substâncias nocivas ao organismo como a creatinina e a ureia. É um tratamento prescrito para os pacientes portadores de insuficiência renal crônica ou aguda. Em diagnósticos como estes, o organismo não é capaz de eliminar tais substâncias devido à deficiência dos mecanismos excretores renais (MARTINS, 2005).

O termo diálise descreve o transporte de água e soluto por meio de uma membrana semipermeável que pode ser artificial, como as membranas dos dialisadores empregados na Hemodiálise ou biológica, como o peritônio, na Diálise Peritoneal (DP). A remoção de solutos durante a diálise ocorre por meio de dois princípios; difusão e ultrafiltração. Difusão: passagem de solutos do meio mais concentrado (plasma) para o menos concentrado (solução de diálise ou dialisato). Ultrafiltração (UF): filtração da água do plasma através da membrana dialítica (Manual de Diálise, 2012).

As máquinas de hemodiálise possuem vários sensores, que tornam o procedimento seguro e eficaz. Os principais dispositivos presentes nas máquinas de diálise são: monitor de pressão, temperatura, condutividade do dialisato, volume de ultrafiltração, detector de ar, entre outros (SILVA *et al*, 1996).

As moléculas através de movimentos randômicos, colidem de maneira aleatória com a membrana semipermeável, promovendo assim o transporte de solutos por difusão. Ao encontrar um poro por onde seja possível a passagem, a molécula atravessa a membrana. Para que isso ocorra, alguns fatores são levados em consideração como o peso da molécula, a resistência da membrana ao soluto

além do gradiente de concentração dos meios envolvidos neste processo (SANCHES, 2008).

Na ultrafiltração, o gradiente de pressão entre os dois lados da membrana, ou gradiente de pressão transmembrana (PTM), determina a velocidade da passagem de água de um lado para o outro. No caso de pressão hidráulica, ocorre a passagem de água do lado de maior para o de menor pressão. Tratando-se de pressão osmótica, ocorre no lado de maior osmolaridade. O transporte por convecção tem importância clínica, quando grandes volumes de ultrafiltrado são obtidos em curto espaço de tempo. Por isso, na hemodiálise ou na diálise peritoneal, a convecção contribui pouco para o transporte de solutos. Esse tipo de transporte é importante na hemofiltração, na qual há significativa passagem de solutos acompanhando grandes volumes de ultrafiltração (SILVA *et al*, 1996).

A separação por diálise é um processo lento, perante as diferenças entre as dimensões das partículas e entre os índices de difusão dos componentes coloidais e cristaloidais. Na hemodiálise, o sangue é obtido de um acesso vascular, unindo uma veia e uma artéria superficial do braço (catéter venoso central ou fístula artério-venosa) e impulsionada por uma bomba até o filtro de diálise, também conhecido como dialisador (Manual de Diálise, 2012).

No dialisador, o sangue é exposto à solução de diálise (também conhecida como dialisato) por meio de uma membrana semipermeável, permitindo assim, as trocas de substâncias entre o sangue e o dialisato. Após ser retirado do paciente e passado através do dialisador, o sangue “filtrado” é então devolvido ao paciente pelo acesso vascular (Manual de boas práticas para hemodiálise, 2012).

A solução de diálise contém solutos (sódio, cálcio, bicarbonato, potássio, magnésio, cloro, acetato, glicose, fósforo, dióxido de carbono) que entraram em equilíbrio com o sangue durante o processo dialítico, mantendo assim a concentração sérica desses solutos dentro dos limites normais. Ressaltando que a água usada durante a diálise deve ser tratada e sua qualidade monitorada regularmente. A presença de compostos orgânicos (bactérias) e inorgânicos (alumínio, flúor, cloramina) podem causar sintomas durante a hemodiálise ou induzir alterações metabólicas consideráveis. A máquina de hemodiálise mantém controle total sobre o dialisato, como nível de condutividade e temperatura da solução, a fim de evitar possíveis complicações durante o tratamento (PEGORARO, 2005).

No processo de diálise, o efluente será o resultado do metabólito do sistema renal, que o organismo não consegue eliminar, ou seja, o tratamento de diálise fornece essa eliminação de metabólitos, que em quantidades excessivas tornam-se tóxicos ao organismo, sendo este o efluente que será lançado aos corpos hídricos (MARTINS, 2005).

## 2.2 Histórico do tratamento de hemodiálise no Brasil

A doença renal em estágio terminal (DRET) é uma doença grave que no ano de 2000 teve sua taxa de mortalidade maior que a maioria dos casos mais letais de câncer. No Brasil, segundo dados do censo realizado em março de 2008, pela SBN, são 41.614 pacientes em diálise sendo a maioria na região Sudeste do país com 23.880, Nordeste com 7.948 pacientes; Sul com 6.394 pacientes; Centro - Oeste com 2.420 pacientes e Norte com 972 pacientes. Em março de 2008, a prevalência de pacientes em diálise por milhão da população (pmp) era de 470. Essa taxa segue apresentando um aumento progressivo, nos últimos anos, chamando a atenção dos profissionais como um problema de saúde pública (SBN, 2012).

As primeiras hemodíalises realizadas no Brasil tinham por finalidade o tratamento de pacientes com Insuficiência Renal Aguda. Somente na década de 60, a hemodiálise e a diálise peritoneal passam a ser modalidades de tratamento para a doença renal crônica. A partir de então, devido aos avanços tecnológicos e científicos, diversos modelos foram desenvolvidos (MAGAJEWSKI, 2005).

A doença renal crônica (DRC) apresenta crescimento progressivo e em proporções epidêmicas, em todo o mundo, com elevadas taxas de mortalidade e morbidade. No Brasil, ainda não existe um sistema nacional de registro que possa fornecer dados confiáveis do ponto de vista epidemiológico sobre a doença renal, como ocorre em determinados países como os Estados Unidos, que contam com a United States Renal Data System (USRD), que fornece informações precisas sobre o perfil da doença no país. Entretanto, inúmeros esforços são realizados para a coleta de dados sobre a doença renal crônica no Brasil, em especial o censo anual da Sociedade Brasileira de Nefrologia (SBN), que busca os dados diretamente das clínicas de terapia renal em todo o país (SBN, 2012).

O Brasil não foge a essa realidade. Estima-se que, dentre a população nacional, milhares de cidadãos possuem algum grau de insuficiência renal. Por

consequência disso, muitos necessitam de tratamento, sendo a diálise o mais utilizado. Esse tratamento requer o uso de uma grande quantidade de água, que retorna ao meio ambiente como efluente (AGÁR *et al*,2007).

Em um paciente submetido a três sessões semanais de diálises, durante quatro horas, utiliza-se 18.000 (dezoito mil) litros de água. Além disso, para cada litro de água utilizável para perfazer o fluído de diálise, até 25% de água que entra no sistema de tratamento de água pode ser enviado para o descarte (SANCHES, 2008).

Conforme a Sociedade Brasileira de Nefrologia (2012), existem 12 milhões de brasileiros com algum grau de insuficiência renal; 52 milhões podem desenvolver a doença, sendo que, aproximadamente 95 mil são renais crônicos, que dependem de diálise ou transplante. Estimativas apontam o crescimento dos casos, ultrapassando 105 mil em 2010. A cada ano cerca de 21.000 brasileiros precisam iniciar tratamento por hemodiálise ou diálise peritoneal. Os principais grupos de risco da doença são idosos, obesos, diabéticos, hipertensos ou com histórico familiar. A insuficiência renal atinge um em cada dez indivíduos, sendo que, 90% não sabem que são portadores da doença. Na falta da ação preventiva e sem sintomas aparentes nos estágios iniciais, a doença manifesta-se quando chega a 50% do comprometimento da função renal, propiciando um diagnóstico tardio. Sendo assim, o paciente precisará de diálise, e nos casos mais graves transplante de rim. Porém, somente 2.700 brasileiros são submetidos a um transplante renal a cada ano.

### 2.3 Histórico da hemodiálise em Santa Catarina

A situação da Doença Renal Crônica em Santa Catarina apresenta diferentes patologias, presentes nas sociedades modernas que são capazes de causar insuficiência renal crônica (IRC) e a sua incidência se manifesta com características epidemiológicas distintas em diferentes partes do mundo, variando entre 90 a 200 casos novos/milhão de habitantes/ano. Nas sociedades ocidentais, as causas mais comuns de IRC são a hipertensão arterial, o diabetes e às glomerulonefrites, embora outras causas como infecções, nefro toxicidade e acidentes peçonhentos sejam importantes causas de IRC, sobretudo nos países emergentes. A Sociedade Brasileira de Nefrologia, em inquérito realizado no período de 1996/97, estimou que as principais doenças reportadas como causa de IRC terminal são hipertensão

arterial (24%), glomerulonefrite (24%) e diabetes mellitus (17%) (MAGAJEWSKI, 2005).

Em Santa Catarina, as doenças do aparelho geniturinário representam aproximadamente 2% do total de óbitos por causas definidas. No entanto, considerando que a doença renal crônica é complicação frequente de uma série de doenças incluídas em diferentes capítulos da Classificação Internacional de Doenças e levando em conta que o sistema de informações sobre mortalidade trabalha tradicionalmente com a “causa básica do óbito”, isto é, com aquela que iniciou o processo patológico que levou à morte, não sendo ainda uma realidade a análise das causas de morte associadas, torna-se difícil mensurar a magnitude da mortalidade por estas patologias (MAGAJEWSKI, 2005).

As mudanças ocorridas no sistema de saúde nas últimas duas décadas e, particularmente, a melhoria da qualidade da assistência em terapia renal substitutiva (TRS) proporcionaram uma importante mudança no perfil demográfico dos pacientes portadores de Doença Renal Crônica no estado. O aumento na oferta de serviços e os avanços relativos à qualidade desses serviços apontam como consequência um provável aumento da sobrevivência, que pode ser medido indiretamente a partir do número absoluto de pacientes, cujo crescimento assume um caráter linear. Em Santa Catarina, o número de TRS realizadas passou de 16.527 em 2000, para 19.972 em 2003, o que representa um incremento de 15,3% em apenas 3 anos (MAGAJEWSKI, 2005).

Das 19.972 TRS realizadas em Santa Catarina em 2003, 134 (0,7%) foram de residentes em outros estados, com destaque para o Rio Grande do Sul e Paraná. A verificação do total de catarinenses que buscaram serviços de TRS em outros estados ainda não está disponibilizada para consulta via internet. Entre os pacientes que fazem uso de TRS, predomina a modalidade da hemodiálise, que respondeu por 89,1% das TRS realizadas, no Brasil (MAGAJEWSKI, 2005).

Segundo a Fundação Instituto de Pesquisa e Planejamento para o desenvolvimento sustentável de Joinville (IPPUJ) em sua publicação: Cidade em dados 2010 – 2011, apresenta os hospitais de Joinville: Hospital Municipal São José, Hospital Regional Hans Dieter Schmidt, Maternidade Darcy Vargas, Hospital Dr. Jeser Amarante Faria, Hospital e Maternidade Bethesda, Hospital Dona Helena, Hospital de Olhos Sadalla Amin Ghanem, Centro Hospitalar da Unimed e Fundação



Pró- Rim, sendo que a Fundação Pró- Rim presta seus serviços de saúde voltados para tratamento renal.

Atualmente, a Fundação Pró-Rim possui 34 máquinas de diálise e atende 160 pacientes e mais 40 pacientes que realizam o tratamento de diálise em casa com uma máquina domiciliar. Os pacientes renais da cidade de Joinville e região podem contar ainda com: o Centro de Tratamento em Doenças Renais que possui 30 máquinas de diálises e atende 148 pacientes, a clínica Vida Center ao lado da Pró-Rim com 23 máquinas e 96 pacientes e a Clínica de Nefrologia que possui 14 máquinas e 50 pacientes, segundo dados registrados no Sistema Único de Saúde (DATASUS, 2012).

#### 2.4 Legislação vigente sobre o destino final do efluente resultante de hemodiálise

Segundo a Resolução – RDC nº 50, de 21 de fevereiro de 2002, que regulamenta os projetos físicos de estabelecimentos assistenciais de saúde; o capítulo 7 – Instalações Ordinárias e Especiais, trata do lançamento externo no subitem 7.1.3 - Caso a região onde o Estabelecimento Assistencial de Saúde (EAS) estiver localizado tenha rede pública de coleta e tratamento de esgoto, todo o esgoto resultante desse estabelecimento pode ser lançado nessa rede sem qualquer tratamento. Não havendo rede de coleta e tratamento, todo esgoto terá que receber tratamento antes de ser lançado em rios, lagos, entre outros. A norma estabelece quando se pode lançar o efluente diretamente na rede, mas não define qual o tipo de tratamento deverá ser feito quando isto não for possível. O tratamento será definido pelo projetista de acordo com as condições locais, e aprovado pelo órgão local responsável pela água e esgoto do município.

A Resolução 430, de 13 de maio de 2011, que dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA, descreve: “Para o lançamento de efluentes em corpos receptores de água doce de Classe 3, e águas salinas e salobras Classe 2, a Concentração do Efluente no Corpo Receptor – (CECR), deve ser menor ou igual à concentração que não causa efeito agudo aos organismos aquáticos de pelo menos dois níveis tróficos”, ou seja: CECR deve ser menor ou igual ao valor da Concentração Letal Mediana-CL<sub>50</sub> dividida por 3, ou

menor ou igual a 100 dividido pelo Fator de Toxicidade (FT), quando for realizado teste de ecotoxicidade aguda.

No artigo 7º, “o órgão ambiental competente deverá, por meio de norma específica ou no licenciamento da atividade ou empreendimento, estabelecer a carga poluidora máxima para o lançamento de substâncias passíveis de estarem presentes ou serem formadas nos processos produtivos, listadas ou não no art. 16 desta Resolução, de modo a não comprometer as metas progressivas obrigatórias, intermediárias e final, estabelecidas para enquadramento do corpo receptor”.

No § 3º “O empreendedor, no processo de licenciamento, informará ao órgão ambiental as substâncias que poderão estar contidas no efluente gerado, entre aquelas listadas ou não na Resolução CONAMA nº 357, de 2005 para padrões de qualidade de água, sob pena de suspensão ou cancelamento da licença expedida”.

A legislação preconizada de Fundação do Meio Ambiente (FATMA), em Santa Catarina para Esgotos domésticos e/ou hospitalares em conformidade com o disposto no PORTARIA 017/02, relativo ao padrão de qualidade, estabelece que o fator de diluição destas amostras para o microcrustáceo *Daphnia magna* sendo como 1 e para a bactéria *Vibrio fisheri* como fator 4 (FATMA, 2002).

## 2.5 Características físico-química do efluente gerado na hemodiálise

Os centros de diálises necessitam da utilização de recursos naturais, como visto anteriormente, a água. Estes centros possuem o enfoque principal em preservar a saúde e a vida dos seres humanos. Entretanto, geram poluentes que poderão ser prejudiciais ao meio ambiente, os quais poderão interferir na saúde pública (TARRASS *et al*, 2008).

Há um déficit em pesquisas que buscam caracterizar a composição dos efluentes provenientes desta atividade, tornando-se preocupante o lançamento destes no meio ambiente.

Estes efluentes são relevantes para pesquisas, pois originam substâncias químicas de difícil remoção pelas estações convencionais de tratamento de água, tais como, organoclorados e resíduos de medicamentos parcialmente metabolizados pelos seres humanos. Algumas substâncias químicas como os organoclorados, após o tratamento convencional de esgoto, têm suas características inalteradas (KÜMMERER *et al*, 1998).

O efluente do tratamento de diálise contém alta quantidade de sódio, potássio e nitrogênio, sendo obrigatória a desinfecção do efluente devido à presença de microrganismo, utilizando o hipoclorito de sódio (SANCHES, 2008).

A deficiência dos processos de tratamento de esgoto coloca em evidência, também a dificuldade na inibição e remoção de vírus (hepatites) e bactérias (gram-negativas, *Pseudomonas*) patogênicas resistentes aos antibióticos provenientes da diálise. Em muitos países em emergência, como no Brasil, os esgotos e efluentes dos hospitais são frequentemente despejados diretamente nos cursos d'água sem qualquer tratamento anterior (EMMANUEL, 2005).

## 2.6 Consequências geradas pelo lançamento de efluentes oriundos dos tratamentos de hemodiálise nos ambientes aquáticos

O lançamento do efluente no meio ambiente, em corpos hídricos, torna a água mais rica em sua composição química, elevando a taxa de nutrientes da água, induzindo ao processo denominado de eutrofização, o que disponibilizará os nutrientes para o crescimento de plantas aquáticas, e microrganismos aquáticos. Gera também a proliferação de dinoflagelados o aumento da biomassa, cuja morte e decomposição posterior, altera o oxigênio dissolvido na água e liberam toxinas, capazes em casos agudos de causar grande mortalidade de peixes; e outros prejuízos ambientais, para o ecossistema aquático (ESKINAZI-LEÇA *et al*, 2004). Henry *et al.* (1983) definem eutrofização artificial ou cultural como o processo de degradação dos ambientes aquáticos como consequência de ações antrópicas. A eutrofização cultural é causada, principalmente, pela descarga de águas residuais domésticas, de efluentes industriais, da drenagem de áreas agrícolas, florestais e urbanas, além da precipitação de material da atmosfera, sob a forma de partículas junto com a água da chuva. Os nutrientes, principalmente, o fósforo e o nitrogênio, oriundos de fontes pontuais ou difusas encontram-se sob diversas formas no corpo aquático, mas nem todas são absorvidas pelo fitoplâncton.

A eutrofização apresenta impactos ao corpo aquático e, segundo Thomann e Mueller (1987), os efeitos indesejáveis causados são: problemas estéticos e recreacionais; grandes variações diurnas na concentração de oxigênio dissolvido podem resultar em concentrações baixas à noite, podendo ocasionar a morte de peixes; fitoplâncton e outras plantas criam uma demanda de oxigênio no sedimento

de sistemas aquáticos que, por sua vez, reduz os níveis de oxigênio dissolvido no hipolímnio de lagos e reservatórios; diatomáceas e algas filamentosas podem bloquear o fluxo de tratamento de filtros e resultar na redução do tempo da retrolavagem; crescimento excessivo de macrófitas aquáticas aderidas que podem interferir na navegação, aeração e capacidade de transporte pelo canal.

O nitrogênio, como um dos elementos mais importantes no metabolismo de ecossistemas aquáticos, e esta importância deve-se principalmente a sua participação na formação das proteínas. O nitrogênio está presente nos ambientes aquáticos sob várias formas: nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), amônia ( $\text{NH}_3$ ), íon amônio ( $\text{NO}_4^+$ ), óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ), nitrogênio molecular ( $\text{N}_2$ ), além de outras formas orgânicas. Dentre essas formas, os que são mais utilizados pelos produtores primários, são o nitrito e a amônia. O nitrito pode também ser utilizado na ausência do nitrato e da amônia, e as formas orgânicas são utilizadas quando não houver disponibilidade de nitrogênio inorgânico (ESKINAZI-LEÇA *et al*, 2004)

Decorrente da eutrofização, há uma diminuição da quantidade de oxigênio dissolvido na água. A quantificação do consumo de oxigênio, em um ambiente poluído pelo lançamento de efluente, pode ser medido através da Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO). Pode-se dizer que a DBO é o método indireto para quantificação da matéria orgânica presente no corpo hídrico. A DBO representa o potencial ou a capacidade que possui uma determinada massa orgânica de consumir o oxigênio dissolvido nas águas de um rio, lago ou oceano. Este consumo, por outro lado, não é praticado diretamente pelo composto orgânico, mas sim o resultado da atividade respiratória de microrganismos que se alimentam da matéria orgânica. A quantidade de esgoto lançado pode ser ou não assimilada pelo corpo hídrico, dependendo da quantidade lançada, vazão e outros fatores (BEM, 2009).

## 2.7 Baía Babitonga e sua relação com águas residuais de Joinville

A Baía da Babitonga está localizada na faixa costeira da porção nordeste do Estado de Santa Catarina, região sul do Brasil, entre as coordenadas  $26^{\circ}02'$  -  $26^{\circ}28'S$  e  $48^{\circ}28'$  -  $48^{\circ}50'W$ . Limita-se em sua porção noroeste pela Unidade Geomorfológica da Serra do Mar e a sudeste pela Ilha de São Francisco do Sul (OLIVEIRA, 2006).

São seis os municípios do entorno da Baía: São Francisco do Sul com 42.520 habitantes; Araquari, com 26.875 habitantes; Barra do Sul, com 8.430 habitantes; Joinville, com 526.338 habitantes; Garuva, com 14.404 habitantes e Itapoá, com 15.658 habitantes; totalizando cerca de 634.225 habitantes na região. A pressão antrópica gerada neste ecossistema, é representada no aporte de efluentes industriais e domésticos e ocupação irregular das margens, entre outros agravantes (IBGE, 2012).

Gradativamente as propriedades naturais dos ecossistemas costeiros são alteradas no litoral, devido à pressão antrópica. A avaliação desses impactos, apenas recentemente vem sendo analisadas. As informações referentes à qualidade da água e do sedimento marinho no estuarino, bem como sobre a estrutura e funcionamento dos ecossistemas envolvidos, são fundamentais para este processo, devido à deposição e incorporação no substrato do estuário. Analisando também a atividade econômica em seu grau de comprometimento dos recursos naturais e da saúde humana é de suma importância justificar os custos de medidas de controle aplicadas (OLIVEIRA, 2006).

## 2.8 Histórico do tratamento de esgoto na cidade de Joinville

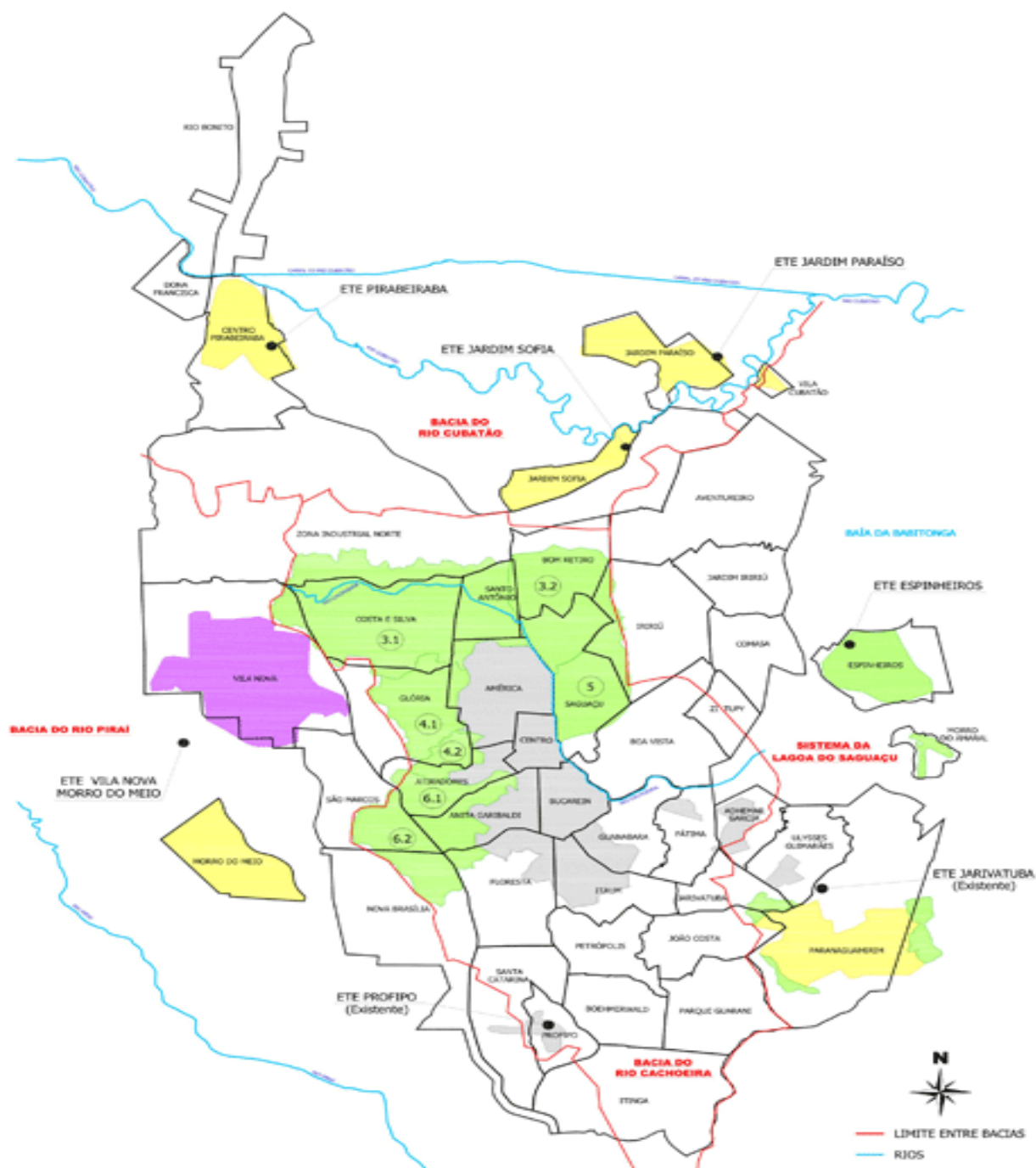
Joinville é a maior cidade de Santa Catarina, com a população aproximada de 526.388 habitantes, segundo o levantamento estimado do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.

Conforme dados da ABES (2012) – Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental, a rede de coleta de esgotos domésticos atinge apenas 16,4% da área da bacia, portanto, os efluentes domésticos gerados no restante da bacia são despejados na rede de drenagem pluvial, contaminando córregos e rios.

Acompanhando o histórico da implantação do tratamento de esgoto na cidade de Joinville, verificou-se que o primeiro sistema de coleta de esgoto na cidade foi no bairro Adhemar Garcia, em 1986, e atendeu a 1250 ligações. Em 1989, entrou em funcionamento a 1ª etapa de Implantação do Sistema de Esgotamento Sanitário da bacia do Rio Cachoeira, com aproximadamente 4.000 ligações nos bairros: Centro, Bucarein e Anita Garibaldi. A 2ª etapa foi concluída em 1997, contemplando aproximadamente 5.000 ligações nos seguintes bairros: América, Atiradores, Floresta, Guanabara e Itaum. O bairro Ulisses Guimarães e parte do bairro Fátima,

também contam com rede coletora de esgotos. O esgoto coletado em todos estes bairros, o que corresponde a aproximadamente 10.000 ligações, é tratado na Estação de Tratamento de Esgotos (ETE) Jarivatuba. Além disso, o loteamento Profipo, no bairro Santa Catarina, possui um Sistema de Coleta de Esgotos com 420 ligações e uma Estação de Tratamento de Esgotos de pequeno porte (Companhia Águas de Joinville, 2012).

A Companhia Águas de Joinville, responsável pelo tratamento de água e esgoto da cidade de Joinville, tem como meta ampliar a abrangência do tratamento do esgoto. O plano de expansão da cobertura de rede de esgotamento sanitário da cidade têm previsto um incremento no número atual da população atendida com rede e tratamento de esgotos sanitários de 16,4%. Esse aumento deve-se em parte, aos contratos assinados com a Caixa Econômica Federal nos bairros: Jardim Paraíso, Vila Cubatão; Jardim Sophia; Morro do Meio; Pirabeiraba (centro) e Paranaguamirim (1ª etapa). Encontra-se em fase de licitação com recursos do Banco Interamericano de desenvolvimento, a obra de Esgotamento Sanitário para o Bairro Vila Nova. Além desses, também temos o PAC - Plano de Aceleração do Crescimento para os Bairros Morro do Amaral, Espinheiros, bacias: 3.1 e 3.2 (Costa e Silva, Santo Antônio, Bom Retiro, Glória, América e Saguçu), 4.1 e 4.2 (Glória, América e Atiradores), 5 (Saguçu), 6.1 e 6.2 (Atiradores, São Marcos, Floresta e Anita Garibaldi) do Rio Cachoeira, conforme figura 1 (Companhia águas de Joinville, 2012).



Fonte: Companhia Águas de Joinville, 2013.

**Figura 1.** Distribuição do tratamento de esgoto da cidade de Joinville

## 2.9 Ecotoxicidade

### 2.9.1 Conceito

O termo ecotoxicologia foi sugerido pela primeira vez em junho de 1969, durante uma reunião do *Committee of the International Council of Scientific Unions*,

em Estocolmo, pelo toxicologista francês René Truhaut. Segundo este autor, a ecotoxicologia é definida como a ciência que estuda os efeitos das substâncias naturais, ou sintéticas sobre os organismos vivos, populações e comunidades, animais ou vegetais, terrestre ou aquáticos, que constituem a biosfera; incluindo assim a interação das substâncias com o meio nos quais os organismos vivem num contexto integrado (PLAA, 1982; CAIMS e NIEDRLEHNER, 1995; Apud ZAGATTO, 2008).

A ecotoxicologia surge como uma ferramenta de monitoramento ambiental, baseada principalmente na resposta de organismos individuais a estressores químicos. Sendo, portanto, uma ciência que objetiva o estudo de fenômenos de intoxicação ambiental em todas as nuances e consequências, com finalidade de impedir e prevenir determinada intoxicação ou saber como interrompê-la, revertê-la e remediá-la, com método específico (AZEVEDO e CHASIN, 2003).

O principal objetivo da ecotoxicologia é a análise custo-benefício no processo de produção de bens de consumo, em que o objetivo é minimizar os custos da produção tanto quanto os efeitos da poluição química causada por esta produção nos seres humanos. Por este motivo foram redigidos protocolos padrão para avaliar os efeitos de substâncias químicas e misturas tóxicas sobre os organismos (MAGALHÃES e FERRÃO FILHO, 2008).

Segundo as definições contidas nas condições e padrões de lançamento de efluentes, a Resolução CONAMA 430/2011, que altera a Resolução CONAMA 357/2005, os ensaios ecotoxicológicos são definidos como ensaios realizados para determinar o efeito deletério de agentes físicos ou químicos a diversos organismos aquáticos. Na tabela 01 relaciona os principais componentes segundo os Padrões de Qualidade de Água da Resolução CONAMA nº 430, de 2011.

Os testes de ecotoxicidade constituem basicamente na exposição de organismos representativos, sob o ponto de vista ecológico, às concentrações conhecidas do agente tóxico por um determinado período. A resposta desses organismos ao agente é avaliada por meio de efeitos ou modificações sobre as funções biológicas fundamentais do organismo teste como: reprodução, crescimento, mutagenicidade e taxa de mortalidade; que afetam diretamente as características das diversas comunidades aquáticas em suas inter-relações recíprocas e entre elas e o meio ambiente (CETESB, 1994).



**Tabela 1.** Classe 3 padrão de água doce após 2001.

<b>PARÂMETROS</b>	<b>VALOR MÁXIMO</b>
Clorofila <i>a</i>	60 µg/L
Densidade de cianobactérias	100.000 cel/mL ou 10 mm <sup>3</sup> /L
Sólidos dissolvidos totais	500 mg/L
<b>PARÂMETROS INORGÂNICOS</b>	<b>VALOR MÁXIMO</b>
Ferro dissolvido	5,0 mg/L Fe
Fluoreto total	1,4 mg/L F
Fósforo total (ambiente lêntico)	0,05 mg/L P
Fósforo total (ambiente intermediário, com tempo de residência entre 2 e 40 dias, e tributários diretos de ambiente lêntico)	0,075 mg/L P
Fósforo total (ambiente lótico e tributários de ambientes intermediários)	0,15 mg/L P
Lítio total	2,5 mg/L Li
Nitrato	10,0 mg/L N
Nitrito	1,0 mg/L N
Nitrogênio amoniacal total	13,3 mg/L N, para pH ≤ 7,5 5,6 mg/L N, para 7,5 < pH ≤ 8,0 2,2 mg/L N, para 8,0 < pH ≤ 8,5 1,0 mg/L N, para pH > 8,5
Sulfato total	250 mg/L SO <sub>4</sub>
Sulfeto (como H <sub>2</sub> S não dissociado)	0,3 mg/L S
Zinco total	5 mg/L Zn

Alguns parâmetros considerados como indicadores de qualidade de água, que serão analisados estão citados a seguir:

**Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO<sub>(5,20)</sub>):** A DBO<sub>(5,20)</sub> de uma água é a quantidade de oxigênio necessária para oxidar a matéria orgânica por decomposição microbiana aeróbia para uma forma inorgânica estável. A DBO<sub>(5,20)</sub> é normalmente considerada como a quantidade de oxigênio consumido durante um determinado período de tempo, numa temperatura de incubação específica. Um período de tempo de 5 dias em uma temperatura de incubação de 20°C é referência em análise e referido como DBO<sub>(5,20)</sub> (MACEDO, 2002).

**Demanda Química de Oxigênio (DQO):** é a quantidade de oxigênio necessária à oxidação da matéria orgânica através de um agente químico. A DQO também é determinada em laboratório, em prazo muito menor do que o teste da DBO. Para o mesmo líquido, a DQO é sempre maior que a DBO (MOTA, 1997).

**Dureza:** é definida como a soma dos cátions polivalentes expressados numa quantidade equivalente de Carbonato de Cálcio (CaCO<sub>3</sub>) (BATALHA e

PARLATORRE, 1998). No ambiente ocorre à associação do magnésio com o íon sulfato, aumentando a dureza da água (DÉOUX e DÉOUX, 1996).

Fosfatos: em amostras de água os fosfatos são encontrados como resultados da lixiviação dos minerais, dos processos naturais de degradação ou da drenagem da agricultura, como um dos produtos da decomposição da matéria orgânica, como resultado de efluentes de diversas atividades humanas (BATALHA e PARLATORRE, 1998).

Nitrogênio Amoniacal (amônia): na água, apresenta-se na forma predominante de íon amônia (exceto em altos valores de pH), mas na literatura especializada, aparece como amoníaco ( $\text{NH}_3$ ), amônia ou nitrogênio amoniacal. A amônia ou nitrogênio amoniacal pode ser um constituinte natural de águas superficiais ou subterrâneas, resultado da decomposição da matéria orgânica. Todavia, altos níveis são usualmente indicadores de poluição de origem doméstica ou industrial (BATALHA e PARLATORRE, 1998).

É uma substância tóxica não persistente e não cumulativa e, sua concentração, que normalmente é baixa, não causa nenhum dano fisiológico aos seres humanos e animais. Grandes quantidades de amônia podem causar sufocamento de peixes e a proliferação de microalgas. Ela é formada no processo de decomposição de matéria orgânica (uréia - amônia). Em locais poluídos seu teor costuma ser alto. O caminho de decomposição das substâncias orgânicas nitrogenadas é chegar ao nitrato, passando primeiro pelo estágio de amônia, por isso, a presença dessa substância indica uma poluição recente (MACEDO, 2002).

Oxigênio dissolvido (OD): é o elemento principal no metabolismo dos microrganismos aeróbios que habitam as águas naturais ou os reatores para tratamento biológico de esgotos. Nas águas naturais, o oxigênio é indispensável os seres vivos, especialmente os peixes, porque a maioria das espécies não resiste a concentrações de oxigênio dissolvido na água inferiores a 4,0 mg/L. É, portanto, um parâmetro de extrema relevância na legislação de classificação das águas naturais, bem como na composição de índices de qualidade de águas (MACEDO, 2002).

A água, em condições normais, contém oxigênio dissolvido, cujo teor de saturação depende da altitude e da temperatura; águas com baixos teores de oxigênio dissolvido indicam que receberam matéria orgânica. A decomposição da matéria orgânica por bactérias aeróbicas é, geralmente, acompanhada pelo consumo e redução do oxigênio da água, o teor de oxigênio dissolvido pode

alcançar valores muito baixos, ou zero, extinguindo-se os organismos aquáticos aeróbios (MOTA, 1997).

Potencial Hidrogeniônico (pH): é a medida da concentração relativa dos íons de hidrogênio numa solução, indica a acidez ou alcalinidade da solução. A influência do pH sobre os ecossistemas aquáticos naturais dá-se diretamente devido a seus efeitos sobre a fisiologia das diversas espécies. Também o efeito indireto é muito importante podendo determinadas condições de pH contribuir para a precipitação de elementos químicos tóxicos como metais pesados; outras condições podem exercer efeitos sobre as solubilidades de nutrientes (MACEDO, 2002).

A desinfecção pelo cloro é outro processo dependente do pH. Em meio ácido, a dissociação do ácido hipocloroso formando hipoclorito é menor, sendo o processo mais eficiente (MOTA, 1997).

Resíduos Totais: todas as impurezas da água, com exceção dos gases dissolvidos, contribuem para a carga de sólidos presentes nos corpos d'água. Sólidos podem ser classificados de acordo com o seu tamanho e características químicas. Os sólidos podem reter bactérias e resíduos orgânicos nos recursos hídricos, promovendo decomposição anaeróbia (MACEDO, 2002).

Mota (1997) cita que as principais fontes de resíduos totais da água são a erosão do solo, os esgotos domésticos, esgotos industriais, lixo e a mineração. Suas principais consequências são o assoreamento de recursos hídricos, a diminuição de vazões de escoamento e de volumes de armazenamento, inundações, soterramento de animais e ovos de peixes, aumento da turbidez da água, redução da transparência da água, diminuição da atividade fotossintética, redução de oxigênio dissolvido, prejuízos e impactos sobre a vida aquática.

Temperatura: é a influência dos processos biológicos, reações químicas e bioquímicas que ocorrem na água e também outros processos como a solubilidade dos gases dissolvidos. A solubilidade dos gases decresce e a dos sais minerais cresce com o aumento da temperatura da água, e a maior parte dos organismos possui faixas de temperatura ótimas para sua reprodução (MACEDO, 2002).

Turbidez: é a medida da dificuldade de um feixe de luz atravessar certa quantidade de água. A turbidez é causada por matérias sólidas em suspensão como partículas constituídas por plânctons, bactérias, argilas, silte em suspensão, fontes de poluição que lança material fino e outros. O aumento da turbidez reduz a zona eufótica, que é a zona de luz onde a fotossíntese ainda é possível ocorrer. O

aumento da turbidez é provocado por erosões, turbulências, lançamentos de efluentes, descargas de galerias de águas pluviais ou transformações de matérias na água. Os resultados são expressos em Unidade Nefelométrica de Turbidez (UNT) (BATALHA e PARLATORRE, 1998).

## 2.10 Testes de ecotoxicidade

A água é constituída por diversos componentes, provenientes do próprio ambiente natural ou foram introduzidos a partir de atividades humanas. Para caracterizar uma água, são necessários a determinação de diversos parâmetros, os quais representam as suas características físicas, químicas e biológicas. Os parâmetros são indicadores da qualidade da água e o que constituem impuras quando seus valores se apresentam superiores aos estabelecidos para sua finalidade de uso ou descarte (MOTA, 1997).

Em função dos objetivos de uso das águas desses corpos receptores de efluentes, é importante que se comece a obter tais informações nas estações em operação, a fim de que se possam avaliar eventuais impactos que um efluente complexo, de baixa biodegradabilidade embora tratado, pode causar à biota. A caracterização química de um efluente isoladamente, não indica o potencial tóxico de uma mistura complexa aos organismos aquáticos. Assim, a ausência ou a presença de toxicidade nos despejos tratados é avaliada pelo uso de organismos vivos (PROSAB 3, 2003).

Os testes ecotoxicológicos, ou bioensaios, para monitoramento e avaliação de qualidade da água, têm se tornado bastante comuns, nos últimos anos, no Brasil. A primeira iniciativa em termos metodológicos se deu em 1975, num programa internacional de padronização de testes de toxicidade aguda com peixes, desenvolvido pelo Comitê Técnico de Qualidade das Águas da *International Organization for Standardization* (ISO), com participação da Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) a convite da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) (ZAGATTO, 2008).

A partir de 1975, foram desenvolvidas e adaptados vários métodos de ensaios de toxicidade aguda e crônica, de curta duração, utilizando alguns grupos de espécies de organismos dentre os quais se destacam as algas a ABNT 1992,

CETESB 1994, para microcrustáceos a ABNT 1993, CETESB 2007 (ZAGATTO, 2008).

O teste de toxicidade aquática é um procedimento, no qual as respostas de organismos aquáticos são usadas para detectar ou medir a presença ou o efeito de uma ou mais substâncias, resíduos ou fatores ambientais, isolados ou em combinação. O teste de toxicidade crônica envolve um estímulo que retarda/persiste ou continua por um período relativamente longo, frequentemente 1/10 do tempo de vida ou mais. Crônico seria considerado um termo relativo, dependendo da duração da vida do organismo. Um efeito crônico pode ser medido em termos de redução no crescimento, redução na produção, etc., além da letalidade (PROSAB 3, 2003).

Segundo os autores Leprat (1998) e Emmanuel *et al.* (2005), a aplicação de ensaios de ecotoxicidade mostra que efluentes de resíduos de estabelecimentos assistenciais à saúde apresentam uma toxicidade elevada. Gartiser *et al.* (1996) mostram que os resultados dos testes de mutação genética indicam que os efluentes dos serviços clínicos e dos laboratórios hospitalares apresentam também um caráter genotóxico. Estes resultados confirmam a existência de substâncias perigosas nestes efluentes.

Segundo Magalhães e Ferrão Filho (2008), considerando que a toxicidade é uma variável dependente da concentração do agente tóxico e do tempo de exposição dos organismos a esse agente, existem dois níveis de mensuração para esta variável: toxicidade aguda e crônica.

O estudo da toxicidade aguda é a manifestação de um efeito em um curto espaço de tempo após a administração de dose única de uma substância. Em geral, é o primeiro estudo realizado sobre uma substância quando não se tem noção ou somente noções teóricas, muito restritas, sobre uma substância a ser estudada. O ensaio de toxicidade aguda permite estabelecer relação entre a dose administrada e a intensidade de efeitos adversos observados e calcular a dose ou concentração letal ( $DL_{50}$ ,  $CL_{50}$ ), expressão matemática da dose ou concentração da substância que provoca a morte de 50% da população exposta (SCHVARTSMAN, 1991).

O estudo da toxicidade crônica tem por objetivo caracterizar o perfil toxicológico de uma substância em uma espécie, após exposição repetida e prolongada, acima de 90 dias. Nas condições desse ensaio, devem manifestar-se os efeitos de longo período de latência ou que são cumulativos (MAGALHÃES e FERRÃO FILHO, 2008).

A substância é administrada durante um longo período em doses (concentrações) compatíveis com a sobrevivência dos elementos-teste. A duração do ensaio poderá ser muito variável, de seis meses a muitos anos. Em geral, muitos estudos são realizados em dois anos. Por causa da duração do experimento e dos sacrifícios intermediários necessários para alguns estudos, o número de elementos testados deve ser mais importante que nos casos de estudos de toxicidade aguda e subaguda. A escolha das doses (concentrações) é função dos resultados obtidos nos ensaios de toxicidade aguda e subaguda (ZAGATTO, 2008).

Os testes ecotoxicológicos são realizados com organismos indicadores que devido as suas características de pequeno limite de tolerância ecológica, a determinadas substâncias químicas que apresentam alguma alteração, seja ela fisiológica, morfológica ou comportamental, quando expostos a determinados poluentes. As exposições são feitas em diferentes concentrações de substâncias e compostos químicos, amostras de efluentes ou água bruta, por um determinado período de tempo (SCHVARTSMAN, 1991).

### 2.11 *Euglena gracilis*

Em estudos de resíduos industriais na água com as *E. gracilis*, esta foi a única espécie fotossintética detectada. Estes fatores tornaram as *E. gracilis*, um excelente modelo para estudos bioquímicos dos mecanismos de resistência a metais pesados, que se associam e acumulam nos cloroplastos (RODRIGUEZ-ZAVALA *et al*, 2007). Devido a estas características, existem diversos estudos de alteração eco-fisiológicas induzidas em *E. gracilis*, causadas por contaminação da água com metais pesados e componentes organometálicos, observadas por análises ultra-estruturais e biológicas (CONFORTI *et al*, 1994, 1995).

Além disso, diferenças bioquímicas e de crescimento foram descritas em uma amostra de *E. gracilis*, isolada de um rio altamente poluído na Argentina (RUIZ *et al*, 2004). Também, estudos de alterações celulares e bioquímicas que ocorreram com as *Euglenas* e outros euglenideos em diferentes condições ambientais induzidas por matéria orgânica, metais pesados e outros componentes contaminantes (CONFORTI *et al*, 1994, 1995; STALLWITZ e HÄDER, 1994; GAJDOSOVA e REICHRTPVA, 1996; EININICKER-LAMAS *et al*, 2002; RUIZ *et al.*, 2004; Apud RODRIGUEZ-ZAVALA *et al*, 2007).

Devido a sua abundância e tamanho, é provável que espécies de *Euglena* sirvam de alimento para ciliados, rotíferos, nematóides e larvas de insetos. No entanto, em situações de estresse, os corpos mucíferos de *Euglena* secretam um muco ao redor da célula que forma um cisto resistente, permitindo que células viáveis de *Euglena* fossem recuperadas no intestino e nas fezes de girinos e insetos. Este encistamento é observado também em culturas de *Euglena* antigas e, provavelmente, ocorre como uma forma de proteção quando as condições não são favoráveis ao seu desenvolvimento. Em alguns casos, as células encistadas são capazes de se dividir, tendo sido observados agrupamentos de até 64 células de euglenas (RUIZ *et al*, 2004).

## 2.12 Ferramenta de monitoramento ambiental – NGTOX

O equipamento de biomonitoramento em tempo real chamado *New Generation Ecotox* (NGTOX) foi desenvolvido e homologado pela Ecobabitonga Tecnologia Ltda., empresa incubada junto ao INOVAPARQ (Parque Tecnológico de Joinville) (ERZINGER *et al*, 2011). O equipamento realiza o biomonitoramento, por meio de análises de imagens em tempo real da qualidade da água. São observados oito parâmetros de movimento (alinhamento, r-value, compactação, área, velocidade média, velocidade para baixo, velocidade para cima e velocidade lateral), avaliando as modificações imediatas promovidas pelas toxinas sobre o comportamento do movimento das Euglenas (MILLÁN DE KUHN, *et al*, 2006; AHMED, 2010; TAHEDL e HÄDER, 2001). A tecnologia aperfeiçou o processo reduzindo o tempo de diagnóstico e os custos. O sistema operacional analisa em tempo real de 300 a 400 imagens por segundo. O software emprega os vetores da pista para registrar o número de células móveis, a porcentagem de células para cima em movimento, a velocidade média, a compactidade (fator forma, que é a razão da circunferência para a área normalizada para círculo) das células e a precisão de orientação (r-value). O software compara as informações atuais com os de uma medição de controle anterior, que foi realizada antes da medição da amostra usando a água destilada, em vez da amostra da substância-teste em diferentes concentrações dosadas no próprio equipamento. O sistema opera em tempo real e controla o número de células em paralelo. O software emprega os vetores para calcular alguns parâmetros como: motilidade, porcentagem de células

para cima em movimento, a velocidade média, compacidade celular e orientação sob a gravidade (r-value) (ERZINGER *et al*, 2011).

O parâmetro de motilidade fornece a percentagem de células que se deslocam a uma velocidade igual ou mais rápida do que a velocidade mínima padronizada no software, e para todos os outros parâmetros são calculados apenas para os objetos que atestam este critério. O parâmetro para cima fornece a percentagem de células que se deslocam para a direção à parte superior da cubeta. O parâmetro orientação sob a gravidade é um parâmetro estatístico que varia de 0 (quando as células se movem aleatoriamente) para 1 (quando todas as células se movem em um único sentido). A compactação da célula (fator relativo a forma, que é a relação da circunferência para a área normalizada a um círculo) mensura a forma da célula e tem o menor valor de 1, quando o contorno da célula é um círculo (absolutamente redonda), aumenta à medida em que a célula aumenta o seu comprimento. Os parâmetros mensurados são comparados com os dados da primeira medição que é a controle, que é realizada antes da medição da amostra utilizando somente água destilada (ERZINGER *et al*, 2011).

A tabela 2 mostra a comparação entre o sistema (NGTOX) New Generation Ecotox e o teste Microtox<sup>®</sup>. Para o NGTOX foram utilizados os valores de CL<sub>50</sub> dos parâmetros mais sensíveis. Os dados para o teste luminescente foram copiados de diferentes publicações (ERZINGER; CIAMPO e HÄDER, 2010).



**Tabela 2.** A comparação entre o sistema (NGTOX) New Generation Ecotox e o teste Microtox®.

Substância Prejudicial	NGTOX		Teste Luminescente (MICROTOX®)		
	CL <sub>50</sub> [mg L <sup>-1</sup> ]	Parâmetro	CL <sub>50</sub> [mg L <sup>-1</sup> ]	Tempo de incubação [min]	Referências*
PCP	3	r-value	1,3	5	1
			0,08	5	1
			1,8	30	2
2,4-DCP	2,1	r-value	1,1	5	1
			5,0	5	1
			2,4	30	2
TBBPA	24,9	Motilidade	-	-	-
Acetona	18984	Fator forma	22270	5	3
			12417	5	1
			18367	5	1
Etanol	5,5-11,1	r-value	40750	30	4
			10494	30	2
			55388	5	1
Formaldeído	27,1	r-value	7,6	30	2
			9,9	5	1
			3,0	5	1
Ni <sup>2+</sup>	7,9	Velocidade	25,2-410	5	5
Ag <sup>+</sup>	0,54	r-value	-	-	-
Hg <sup>2+</sup>	13,9	r-value	0,03-0,32	5	3
			0,35	30	2
As(V)	>400	-	3	5	3
AS(III)	141	Fator forma	-	-	-
Cu <sup>2+</sup>	4,0	Fator forma	1,2-20	5	1
			34,4	30	2
Pb <sup>+</sup>	40,1	Motilidade	0,85	30	1
Cr(VI)	27,8	r-value	70-100	5	3
			7,83	30	6
CO <sup>2+</sup>	4,3	r-value	135-177	5	3
Zn <sup>+</sup>	164	Motilidade	2-49	5	3
			26,3	30	2
CN <sup>-</sup>	41	Fator forma	2,8-13,3	5	3

**\*Referencias:**

<sup>1</sup>Kaiser, K. L. E. and Palabrica, V. S. (1991): *Photobacterium phosphoreum* toxicity data index. Water Poll. Res. J. Canadá 26, 361-431.

<sup>2</sup> Referenzliste Chemikalien für den LUMISTox Leucht bakterientest (1997). Info 04. Dr. Bruno Lange GmbH Berlin (FRG).

<sup>3</sup>Munkittrick, K. R. and Power, E. A. (1991): The relative sensitivity of Microtox®, *Daphnia*, *Rainbow trout*, and *Fathead minnow* acute lethality tests. Environ. Toxicol. Water Qual. 6, 35-62.

<sup>4</sup>Gellert, G. und Stommed, A. (1994): Akut- und chronisch-toxische Eigenschaften ausgewählter chemischer Substanzen und industrieller Abwässer gegenüber Leuchtbakterien. Wasser abwasser 135, 1-7.

<sup>5</sup>Blaise, C., Forghani, R., Legault, R., Guzzo, J. and Dubow, M. S. (1994): A bacterial toxicity assay performs with microplates, microlumimetry and Microtox® reagent. BioTechniques 16, 932-937.

<sup>6</sup>Backhaus, T., Froehner, k., Altenburger, R. and Grimme, L. H. (1997): Toxicity testing with *Vibrio fischeri*: a comparison between the long term (24 h) and the short term (30 min) bioassay. Chemosphere 35, 2925-2938.

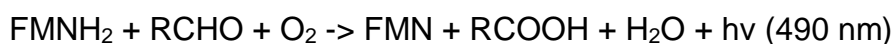
### 2.13 *Vibrio fischeri*

*Vibrio fischeri* é um membro do filo proteobacteria. Estas bactérias são móveis, gram-negativas que são encontrados em águas marinhas temperadas e sub-tropicais. Estas bactérias heterotróficas usam flagelos como meio de circulação e são mais conhecidas por suas propriedades de bioluminescência. Vive em simbiose com vários animais marinhos de águas profundas, como peixes e lulas *Monocentrid bobtail*. Ela pode ser encontrada dentro de órgãos, ou como parte do intestino normal destes animais marinhos. Esta bactéria também pode ser encontrada vivendo como bactérias livres em pequenas quantidades e sobrevivem em matéria orgânica em decomposição (MICROBEWIKI, 2011).

A *V. fischeri* é utilizada devido suas proteínas serem codificadas por um conjunto de genes do operon lux que produzem bioluminescência. A luz é produzida numa reação química onde a luciferina é oxidado pela enzima luciferase. Como resultado da oxidação, uma luz azul-esverdeada é emitida. Do mesmo modo, as células de *V. fischeri* foram disponibilizadas comercialmente para ecotoxicologistas para detectar contaminantes no ambiente de forma mais rápida e mais barata do que a maioria dos outros métodos disponíveis (KEGG, 2001).

*Vibrio fischeri* é uma bactéria gram-negativa com oxidase positiva bioluminescente marinha composta por uma parede celular com uma membrana exterior constituída por membrana citoplásmica interior, coberta pela camada de peptidoglicano, seguida por um espaço periplasmático aos lipopolissacáridos. São hastes retas com 0,8-1,3 µm de diâmetro e 1,8-2.4µm de comprimento. As bactérias têm flagelos polares 1-3 desembainhada (AUBREY, 2007).

Segundo Devid Aubrey (2007), essa bactéria é capaz de produzir metabolismo fermentativo e respiratório, porque é um quimio-organotrófico. *Vibrio fischeri* é uma bactéria anaeróbia facultativa. A produção de bioluminescência é ativada pelas proteínas que são codificadas por um conjunto de genes referidos como o operon lux. Esta reação libera energia livre na forma de luz azul-esverdeada em 480 nm-490 nm (azul-verde). A reação que ocorre em *Vibrio fischeri* é a seguinte:



O rendimento quântico de bioluminescência foi estimada como sendo de 10-30% de acordo com a Encyclopedia of Life Sciences (AUBREY, 2007).

#### 2.14 Ferramenta de monitoramento ambiental - Microtox®

O sistema Microtox® tem sido utilizado como um teste de toxicidade aquática desde o início dos anos 1980 e é aceito como um teste padrão em vários países, incluindo Brasil. Nos Estados Unidos, é um método de teste reconhecido em vários programas federais. A EPA dos EUA, adotou Microtox® como um teste padrão em um programa contínuo de avaliação e remediação de sedimentos contaminados. Microtox® foi adotado por Wildlife Service como teste de triagem no Centro Nacional de Investigação aministrante de Pescas dos EUA. Microtox® é igualmente reconhecido no Canadá, Reino Unido, Alemanha, Suécia e Holanda. (AZUR Environmental, 1998).

No Brasil, a Norma técnica da CETESB L5.227 – 2001, denominada “Teste de toxicidade com a bactéria luminescente *Vibrio fischeri*: método de ensaio” valida este método utilizando o sistema Microtox® (CETESB, 2012).

O analisador Microtox® Modelo 500 (M500) é um modelo de laboratório, com temperatura controlada, fotômetro de auto-calibração, que mede a toxicidade aguda. As aplicações incluem o teste de amostras que contêm toxinas biológicas, efluentes industriais, águas de processos industriais, efluentes municipais, resíduos perigosos, solo, sedimentos, águas pluviais e produtos médicos para reatividade bio (AZUR Environmental, 1998).

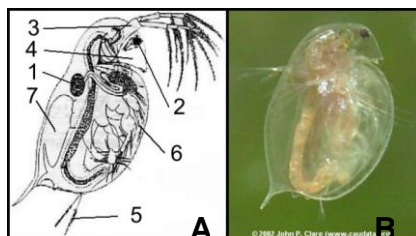
O procedimento utiliza a bactéria marinha bioluminescente (*Vibrio fischeri*) como organismo de teste. As bactérias são expostas a uma gama de concentrações do material a ser testado. A redução da intensidade da luz emitida a partir das bactérias é medida juntamente com as soluções padrão e com as soluções das amostras de controle. A alteração na intensidade de luz e da concentração do agente tóxico produz uma relação de dose e resposta. Os resultados são normalizados e o CL<sub>50</sub> (concentração que produz uma redução de 50% na luz) é calculado (AZUR Environmental, 1998).

## 2.15 *Daphnia magna*

Os microcrustáceos desempenham, conforme Araújo e Aragão (2007), desempenham um papel importante na cadeia alimentar, refletindo mudanças populacionais e comportamentais que podem interferir nos outros níveis tróficos do ecossistema aquático. As mesmas autoras confirmam que estes organismos possuem grande potencial para o uso em testes de toxicidade, pois são facilmente cultivados em laboratório, possibilitando a obtenção de populações homogêneas e com sensibilidade constante.

Um exemplo de microcrustáceo muito utilizado em testes toxicológicos padronizados é a *Daphnia* (fig. 2), conhecido como “pulga d’água”, é facilmente encontrada em lagos, represas, e lagoas de águas continentais. Mede cerca de 0,5 a 5,0mm de comprimento, possui olho composto evidente que é sensível à mudança da qualidade e quantidade de luz. Possui hábito filtrador, alimentando-se de algas, bactérias, protozoários e detritos orgânicos presentes na água (ARAÚJO e ARAGÃO, 2007).

**Figura 2.** Anatomia da fêmea: 1- coração, 2- olho composto, 3- antenas, 4- ocellus, 5- pelos, 6- pernas e 7- bolsa para ovos (A) e exemplar de *Daphnia* sp. (B).



Fonte: <http://www.caudata.org/daphnia/>.

As espécies recomendadas pelos principais procedimentos padronizados são *Daphnia magna*, *D. pulex* e *D. similis*, cada uma indicada para um grau de dureza da água de cultivo. *D. similis* é uma espécie introduzida no Brasil, mas que possui sensibilidade similar às outras espécies (ARAGÃO e ARAÚJO, 2008).

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Coleta da amostragem

Entre os quatro centros de diálise em Joinville, foi escolhido ao acaso um destes centros. Para análise toxicológica dos efluentes gerados destes centros as amostras foram coletadas em quatro dias diferentes (08/11/2012 e 15, 17 e 21 de 01 de 2013). Para a realização da coleta das amostras, instalou-se uma bomba peristáltica na tubulação da saída de efluente ligado a máquina de diálise, facilitando a coleta da amostra. Este sistema coletor de efluentes era interligado a 14 máquinas simultâneas de hemodiálises, sendo que, em cada uma havia um paciente.

Para coleta das amostras e transporte foram utilizados frascos plásticos de 1000 mL estéreis. Após as coletas, o material foi transportado até o laboratório de Fotobiologia, na Universidade da Região de Joinville – Univille, campus Joinville, localizada no bairro Bom Retiro.

As amostras foram armazenadas para a caracterização química e a realização dos testes no NGTOX, Microtox<sup>®</sup> e com as *Daphnia magna*. As amostras foram preservadas no freezer em congelamento rápido.

#### 3.2 Caracterização físico-química do efluente resultante da hemodiálise

Ao chegar da coleta no laboratório de Fotobiologia, foram registrados os dados físicos através do medidor de multiparâmetros F – HI9828, Hanna Instruments, certificado pela ISO 9001, os parâmetros mensurados foram: pH, condutividade, salinidade, turbidez, dureza, oxigênio dissolvido e temperatura.

As análises químicas foram realizadas, pelo método de colorimetria, no equipamento Smart 3, Poli Control Instrumentos Analíticos, certificado pela ISO 9001, em conformidade com EPA (USA) Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, com a mensuração de cada composto químico: Nitrito, Nitrato, Fosfato, Amônia, Sílica, Sulfato.

A análise de demanda química de oxigênio foi aplicada segundo a metodologia da Standard Methods (1998), determinada por meio de espectrofotometria no espectrofotômetro HACH Instruments, modelo DR 4000.

A análise de Demanda Bioquímica de Oxigênio – DBO (5,20) foi aplicada segundo a metodologia da Standard Methods (1998). A amostra permaneceu dentro da incubadora por 5 dias a 20° C, conectada a um oxímetro registrando o valor da DBO.

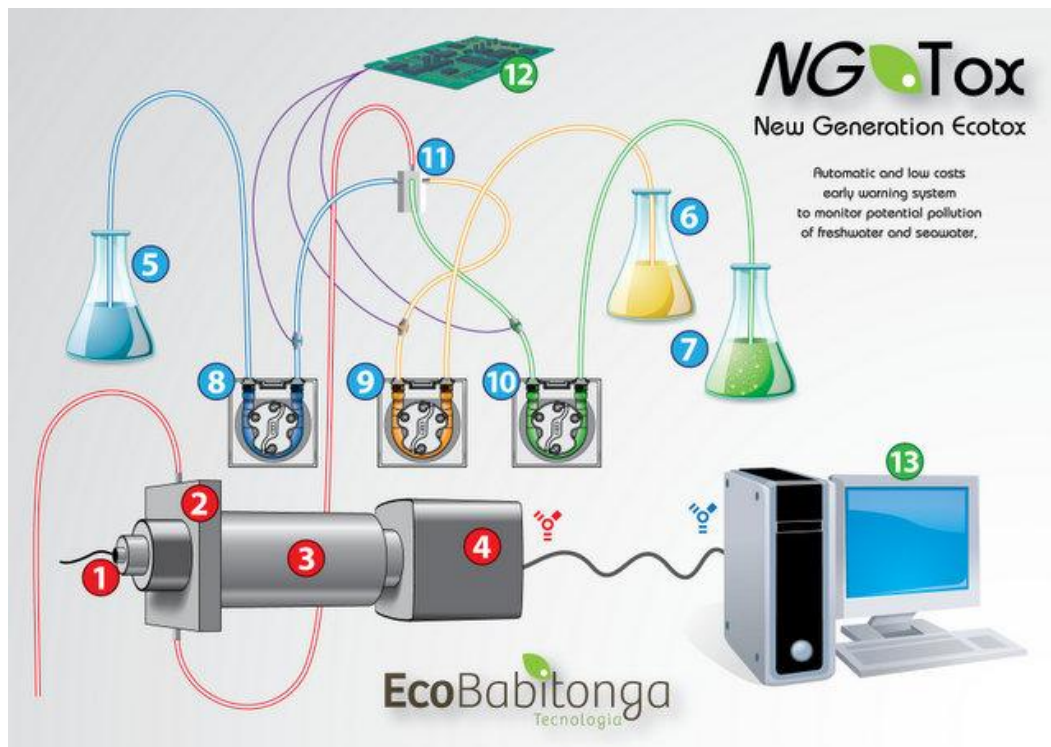
Todas as análises físico e química foram comparados os resultados obtidos com o CONAMA 430 (2011).

### 3.3 Fitoplâncton e Manutenção

Os testes foram realizados com as cepas de *Euglena gracilis*, obtidas da coleção da Universidade de FAU, Alemanha. Estas foram mantidas no meio de cultura mineral e orgânico, conforme descrição feita por Checcucci *et al.* (1976). A manutenção da cultura ocorreu em uma incubadora estéril BOD 411 – marca Quimis, sob a exposição a luz em dose de 20 watts/cm<sup>2</sup>, e temperatura de 20° C.

### 3.4 Análises de toxicologia ambiental através do NGTOX

O instrumento NGTOX foi desenvolvido e homologado pela Ecobabitonga Tecnologia Ltda (ERZINGER, CIAMPO e HÄDER, 2011), cujo esquema está ilustrado na figura 3. É um dispositivo que realiza bioensaios automaticamente usando técnicas de análise de imagem em tempo real, com o auxílio de micro-organismos teste como a alga unicelular *Euglena gracilis*, para águas dulcícolas, isto é, procura determinar a toxidade a partir de alterações fisiológicas sofridas por um micro-organismo. O NGTOX procura por alterações no comportamento do movimento dos organismos sensíveis a substâncias tóxicas, radiação nuclear e ultra violeta. O NGTOX mede também propriedades celulares como a quantidade de organismos em um tempo “t” [s] e a área média destes organismos [ $\mu\text{m/s}$ ].



Fonte: Erzinger *et al*, 2010.

**Figura 3.** Esquema demonstrativo do Instrumento NGTOX.

O princípio de funcionamento do NGTOX tem como base a transferência por uma bomba peristáltica acionada por motor de passo [10], de forma automática, de uma suspensão de células [7] para uma cubeta de observação [2], via uma câmara escura de mistura [11]. As imagens do movimento destas células são detectadas e gravadas por uma câmera CCD (*Charge Coupled Device*) [4] conectada a um microscópio [3], devidamente iluminado [1]. Estas imagens são digitalizadas e exibidas no monitor de um computador [13]. Um software denominado *ImagingTox*, determina os parâmetros de movimento e analisa a motilidade (percentagem de células mortas), a precisão da orientação gravitacional, a velocidade e forma das células, e armazena todas estas informações em um banco de dados (ERZINGER *et al*, 2010).

Após esta primeira medida de controle, a cubeta é lavada e outra quantidade de células em suspensão é bombeada para a cubeta, também via câmara de mistura [11], e misturada com uma amostra de teste [6] bombeada por [9]. Os parâmetros de movimento são determinados mais uma vez. A inibição de cada parâmetro, em comparação com o controle não tratado é calculada utilizando

o princípio da média móvel, por comparação da sobreposição de áreas de controle da amostra e curvas. Estas informações também são gravadas em banco de dados (ERZINGER *et al*, 2010).

#### 3.4.1 Princípio de medição

Uma medição simples com o NGTOX dura 5 min. Durante este intervalo de tempo todos os organismos identificados na faixa de interesse são utilizados para calcular os parâmetros de motilidade, através do princípio da média móvel. Em cada caso um certo número de vetores de posição, que podem ser definidos no software, são utilizados para o cálculo dos parâmetros.

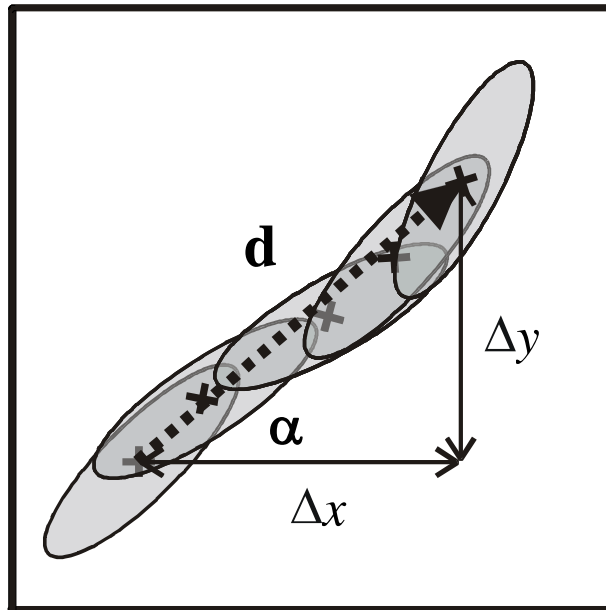
Os pontos de dados calculados estão representados como uma função do tempo de medição e são devidamente armazenados na forma digital. Tanto no modo “*on-line*” quanto no modos de toxina única uma medição de controle sem toxinas é realizada primeiramente. Para excluir as diferenças devido ao efeito de diluição, a medida de controle é de 1:1, diluído com água destilada.

#### 3.4.2 Os parâmetros de movimento e de forma

Os vetores de movimento são calculados a partir da sequência de vídeo atual, digitalizados e armazenados em memória. São considerados apenas os objetos sem contato com a borda da imagem, e distinguidos os objetos móveis dos imóveis, ou seja, aqueles que tem uma velocidade maior que a velocidade de sedimentação, para os quais são calculados seus centros de gravidade, excluindo aqueles objetos cuja área é maior ou menor do que um valor previamente definido.

A) Vetor de movimento, ilustrado pela linha tracejada na figura 4, é calculado através do deslocamento do centro de gravidade dos objetos móveis.





Fonte: NGTOX

**Figura 4.** Modelagem matemática para Cálculo do vetor de movimento da célula de *Euglena gracilis*

$$\alpha = \arctan \frac{\Delta y}{\Delta x} = \arctan \left| \frac{y_1 - y_2}{x_1 - x_2} \right|$$

$$d = \sqrt{(\Delta y)^2 + (\Delta x)^2}$$

$$v = k \frac{d}{\Delta t} = k \frac{\sqrt{(y_2 - y_1)^2 + (x_2 - x_1)^2}}{t_1 - t_2}$$

Onde:

$d \equiv$  Módulo do vetor;

$\alpha \equiv$  Ângulo do vetor em relação ao sistema de coordenadas previamente escolhido;

$k \equiv$  Fator de calibração.

B) Percentagem de motilidade,  $M$  [%] – dos organismos é dada por:

$$M = \frac{n_s}{n} \cdot 100\%$$

Onde:

$n_s$  – Quantidade de vetores utilizado para calcular a velocidade, acima de um threshold pré-determinado.

$n$  – Quantidade de todos os vetores usados para cálculo.

C) Precisão da orientação, *r-value* é o valor estatístico que mostra o quão boa é a orientação dos objetos. Todavia não contém nenhuma informação sobre a direção da orientação. Os valores possíveis de *r* encontram-se no intervalo entre zero e um. Quando  $r = 0$  significa que a orientação dos vetores é totalmente aleatória. A quantidade *r-value* é dada por:

$$r = \frac{\sqrt{\left(\sum_{i=1}^{n_s} \sin \alpha_i\right)^2 + \left(\sum_{i=1}^{n_s} \cos \alpha_i\right)^2}}{n_s}$$

Onde:

$\alpha$  – Desvio angular em relação à vertical, para cada vector que corresponde a um organismo com motilidade.

E) Alinhamento,  $A_i$  – é dado por:

$$A_i = \frac{\sum_{i=1}^{n_s} |\sin \alpha_i| - \sum_{i=1}^{n_s} |\cos \alpha_i|}{n_s}$$

F) Movimento ascendente, O ângulo da distribuição principal –  $\theta$  – é um dos parâmetros que fornece informações sobre o movimento da população na direção vertical, devido a ação da força da gravidade. Se for superior a 50%, mais objetos estão se movendo para cima do que para baixo.

$$\theta = \begin{cases} \arctan \left( \frac{\sum_{i=1}^{n_s} \sin \alpha_i}{\sum_{i=1}^{n_s} \cos \alpha_i} \right) & \text{para } \sum_{i=1}^{n_s} \cos \alpha_i > 0 \wedge \sum_{i=1}^{n_s} \sin \alpha_i > 0 \\ \arctan \left( \frac{\sum_{i=1}^{n_s} \sin \alpha_i}{\sum_{i=1}^{n_s} \cos \alpha_i} \right) + 360^\circ & \text{para } \sum_{i=1}^{n_s} \cos \alpha_i > 0 \wedge \sum_{i=1}^{n_s} \sin \alpha_i < 0 \\ \arctan \left( \frac{\sum_{i=1}^{n_s} \sin \alpha_i}{\sum_{i=1}^{n_s} \cos \alpha_i} \right) + 180^\circ & \text{para } \sum_{i=1}^{n_s} \cos \alpha_i < 0 \\ 90^\circ & \text{para } \sum_{i=1}^{n_s} \cos \alpha_i = 0 \wedge \sum_{i=1}^{n_s} \sin \alpha_i > 0 \\ 270^\circ & \text{para } \sum_{i=1}^{n_s} \cos \alpha_i = 0 \wedge \sum_{i=1}^{n_s} \sin \alpha_i < 0 \\ \text{n\~{a}o dedfinido} & \text{para } \sum_{i=1}^{n_s} \sin \alpha_i = \sum_{i=1}^{n_s} \cos \alpha_i = 0 \end{cases}$$

O direcionamento do movimento ascendente ou descendente é dado por:

$$Upward [\%] = \frac{n_o}{n_s} \cdot 100\%$$

Onde:

$n_o$  – Quantidade de vetores no primeiro e quarto quadrantes (movimento ascendente).

G) Área dos objetos selecionados é:

$$A_r = \frac{\sum_{i=1}^{n_s} P_{n_s}}{n_s} \cdot s [\mu m]$$

Onde:

$P_{n_s}$  – Área [pixel] dos objetos com motilidade

S – Fator de escala: comprimento [ $\mu m$ ] / comprimento [pixel]

H) Compacidade é dada pelo parâmetro Fator de Forma que é a razão entre a área da circunferência e a área do círculo normalizado

$$\text{Compacidade} = \frac{\sum_{i=1}^{n_s} \frac{U_{n_s}^2}{F_{n_s} \cdot 4\pi}}{n_s}$$

Onde:

$U_{ns}$  – Circunferência dos objetos com motilidade

$F_{ns}$  – Área dos objetos com motilidade

I) Velocidade total é dada em [ $\mu\text{m/s}$ ] e é calculada pela equação:

$$v = \frac{\sum_{i=1}^{n_s} v_i}{n_s} \cdot s$$

Onde:

$$v_i = \frac{d}{\Delta t}$$

$d$  – Valor de cada vetor declarado como motilidade

$\Delta t$  – Tempo decorrido para o cálculo dos vetores.

J) Velocidade ascendente se obtém a Top-speed [ $\mu\text{m/s}$ ], ou seja, para vetores com ângulos entre:

$$0^\circ \leq \alpha \leq 60^\circ \vee 300^\circ \leq \alpha < 360^\circ$$

$$v_{ts} = \frac{\sum_{i=1}^{n_{up}} v_i}{n_{up}} \cdot s$$

K) Velocidade descendente se obtém a Bottom-speed [ $\mu\text{m/s}$ ], isto é, para vetores com ângulos entre:

$$120^\circ \leq \alpha \leq 240^\circ$$

$$v_{down} = \frac{\sum_{i=1}^{n_{down}} v_i}{n_{down}} \cdot s$$

L) Velocidade lateral se obtém a Side-speed [ $\mu\text{m/s}$ ], isto é, para vetores com ângulos entre:

$$60^\circ < \alpha < 120^\circ \vee 240^\circ < \alpha < 300^\circ$$

$$v_{side} = \frac{\sum_{i=1}^{n_{se}} v_i}{n_{se}} \cdot s$$

### 3.5 Teste de atividade aguda para *Euglena gracilis* utilizando o NGTOX

Nos testes com a *Euglena gracilis*, foi utilizada a ferramenta de biomonitoramento em tempo real chamada NGTOX. Este equipamento monitorou e avaliou em tempo real, onze parâmetros diferentes na *Euglena gracilis*, quando exposta ao efluente da diálise.

Foram analisadas a amostras em triplicata a partir da diluição da amostra, automaticamente crescente nas escalas 1:1, 1:3, 1:7, 1:15 e 1:31. Entre cada análise o equipamento faz uma lavagem com água destilada por dois minutos.

Os ensaios foram baseados na resposta da *Euglena gracilis*, a exposição do efluente proveniente dos efluentes da hemodiálise. Foram analisadas as diferentes funções, variáveis ou parâmetros, tais como o percentual de motilidade, r-value, direção, velocidade média, velocidade para cima, velocidade para os lados, velocidade para baixo, gravitaxia, alinhamento, densidade, tamanho médio das células.

### 3.6 Controle de sensibilidade *Daphnia magna*

A sensibilidade dos organismos-teste foi testada mensalmente, com objetivo de assegurar a qualidade dos mesmos dentro dos padrões internacionais e garantir a validação dos testes realizados, conforme ISO 6341 (ISO, 1996). Para isso, foram realizados testes de toxicidade aguda com a substância de referência dicromato de potássio ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ). Consideram-se aptos para utilização em testes os neonatos produzidos em lotes de cultivos que apresentam CE50 24h entre 0,6 e 1,7 mg/L de dicromato de potássio (ISO 6341, 1996).

### 3.7 Metodologia de teste agudo *Daphnia magna*

A metodologia de teste agudo com o organismo-teste *Daphnia magna* também seguiu o descrito na NBR 12.713 (ABNT, 2003a). As amostras coletadas foram testadas baseando-se na exposição de neonatos de *Daphnia magna*, de 2 a 26 horas de idade, em diluições da amostra, por um período de 48 horas.

A partir da amostra, para cada teste foram preparadas 5 diluições (solução-teste) e um controle. As diluições foram preparadas com precisão volumétrica, em progressão geométrica de razão 2.

No controle e como diluente foi usado água de diluição, também chamada meio ISO, descrito na norma ISO 6341 (ISO, 1996). Após o preparo, a água de diluição era aerada por, pelo menos, 12 horas para solubilização total dos sais, saturação do oxigênio dissolvido e estabilização do pH. Registravam-se os valores de oxigênio dissolvido, pH e dureza total antes da utilização da água de diluição.

No controle do teste, a imobilidade aceita é de no máximo 5%. Cada diluição foi colocada em 4 béqueres de 50 mL, com aproximadamente 25 mL de solução-teste em cada um. Foram testados 20 organismos por diluição, sendo expostos 5 em cada béquer. Os organismos-teste foram adicionados aos béqueres, fazendo-se a distribuição sempre da menor para a maior concentração do agente tóxico, iniciando pelo controle. Os frascos foram cobertos com filme de PVC e levados para a germinadora de teste. Durante o período de teste foram mantidos de 18°C a 22°C, sem alimentação ou iluminação.

Após o tempo de prova (48 horas) 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 - CL<sub>50</sub> 48 h, 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 CL<sub>50</sub> 48 h foi calculada utilizando-se os métodos estatísticos Probit Method (WEBER, 1993), para dados paramétricos e Trimmed Sperm-Karber Method (HAMILTON *et al*, 1977), para dados não paramétricos.

### 3.8 Determinação da toxicidade crônica de *Daphnia magna*

Para realização dos testes, foram utilizados organismos jovens, com 2 a 26 horas de idade, obtidos a partir da quarta postura de fêmeas cultivadas. O método consiste na exposição dos organismos jovens da espécie *Daphnia magna*, a várias diluições da amostra por um período de 21 dias.

Cada ensaio foi realizado com 5 diluições da amostra, além do controle negativo (somente água reconstituída - meio M4). As diluições (soluções-teste) foram preparadas com precisão volumétrica, em progressão geométrica de razão 1,25. Para cada diluição, utilizaram-se 10 réplicas, dispondo individualmente 10 organismos jovens de *Daphnia magna* em béqueres de 50 mL. Cada béquer recebeu uma alíquota de 25mL da solução-teste e foi coberto com filme de PVC para evitar a evaporação e contaminação do teste com possíveis resíduos suspensos no ar.

As soluções-teste foram preparadas no momento da exposição do organismo, utilizando as devidas proporções de amostra e água reconstituída.

O organismo-teste foi exposto à solução-teste, sendo transferido de forma a evitar a alteração da concentração final da mesma. Para tal utilizou-se um coletor de micro crustáceo (artefato semelhante à pipeta volumétrica de 25 mL, cortada na extremidade inferior) a fim de não causar danos ou estresse aos indivíduos. Teve-se o cuidado de liberar o organismo próximo da superfície da solução para evitar a entrada de ar sob sua carapaça e consequente flutuação.

Os testes foram mantidos nas mesmas condições ambientais que os lotes de cultivo, com luminosidade difusa (foto período de 16 horas de luz) e temperatura de 18°C a 22°C. Os organismos-teste receberam diariamente alimentação, sendo fornecido como alimento a alga clorofícea *Scenedesmus subspicatus*, em concentrações próximas a  $10^7$  células/mL, *ad libitum*.

Os organismos foram acompanhados durante o teste, na primeira semana com observações diárias e, após este período, com leituras três vezes por semana, em dias intercalados: segundas, quartas e sextas-feiras. Nestes momentos observavam-se sobrevivência e número de jovens gerados por fêmea.

Na leitura também substituía-se a solução-teste antiga (com 48h), caracterizando um teste semiestático, tendo-se o cuidado de as soluções-teste estarem na temperatura de 18°C a 22°C no momento da transferência dos

organismos. Em cada troca da solução-teste, retirou-se a *Daphnia* adulta e as *Daphnias* jovens do béquer. As *Daphnias* adultas eram temporariamente colocadas em um recipiente livre de contaminação. A solução-teste contida no béquer era descartada, higienizava-se o béquer com água destilada e gases, e este recebia nova alíquota de solução-teste. Contavam-se e registravam-se as *Daphnias* jovens, e transferia-se somente a *Daphnia* adulta para o béquer. Este procedimento evitava que os metabólitos alterassem a qualidade do ambiente, mascarando os resultados ou a disputa por espaço e alimento. As *Daphnias* jovens encontradas mortas ou imóveis não foram contabilizadas.

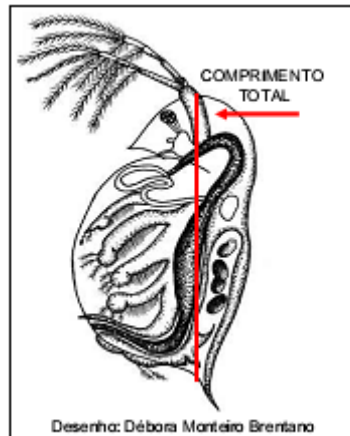
No período entre 0 e 5º dia os organismos teste são filhotes. Do 6º ao 9º dia, ocorre a preparação para reprodução, com formação dos primeiros ovos na câmara incubatória. Entre o 10º a 13º dia, tem-se o ápice da reprodução. No período entre 14º a 17º dia a reprodução é boa, passando a irregular após o 18º dia de teste.

### 3.9 Parâmetros analisados durante o teste crônico

Visando avaliar as amostras testadas, três parâmetros foram analisados na execução do teste: longevidade, crescimento e fecundidade. Longevidade é o tempo de vida de um organismo sob determinado conjunto de condições de desenvolvimento (FONSECA, 1991). Nos experimentos, este parâmetro foi obtido pelo acompanhamento da sobrevivência dos organismos até o final do teste (21 dias), expressando o parâmetro em número de *Daphnias* sobreviventes após esse período.

Crescimento se expressa fundamentalmente como a variação de uma dimensão do indivíduo, geralmente comprimento total ou peso, em função da idade (MARGALEF, 1977 apud BOHRER, 1995). Optou-se pela medição do comprimento dos organismos para avaliar este parâmetro. A medição do comprimento foi realizada ao final do teste (21 dias), usando uma lâmina com escala de 1 cm, milimetrada. Utilizou-se o microscópio ótico com aumento de 40 vezes para medição. Considerou-se o comprimento total do indivíduo o comprimento da cabeça até o final da carapaça, desconsiderando o espinho apical, conforme figura 5.





Fonte (BRENTANO,2006)

**Figura 5.** Medida do comprimento total de *Daphnia magna*.

As *Daphnias* que morreram antes do final do teste também foram medidas, desde que a morte tivesse ocorrido após o 18º dia de teste. A medida de eventuais machos presentes nos testes não foram contabilizados para geração das médias de crescimento devido ao dimorfismo sexual.

A fecundidade foi avaliada pela contagem dos neonatos gerados pelas fêmeas no período de 21 dias. Como parâmetro foi utilizada a média de filhotes gerados por fêmea, considerando o número de posturas ao longo do teste. Esta média foi obtida através da seguinte equação:

$$\text{Fecundidade Média} = \frac{\text{n}^\circ \text{ total de filhotes}}{\text{n}^\circ \text{ de mães} \times \text{n}^\circ \text{ de posturas}}$$

Para cálculo desta média, no caso de haver morte de adultas, não considera-se a mãe e exclui-se o número de filhotes que ela havia produzido até então. Mas esta subtração só é feita quando a fêmea morre antes do 18º dia de teste, pois, após este período, a reprodução é numérica variável e a ausência de filhotes neste período não interfere nos dados levantados.

No caso de existir um macho entre os organismos-teste adultos que estão sendo testados, deve-se usá-lo como dado para avaliação da longevidade, mas não poderá entrar nos dados de crescimento e fecundidade.

O tamanho do corpo das fêmeas foi estimado no início e no final do teste, por extrapolação a partir do comprimento do exopodite bucal da exuvia (PEREIRA *et al.*, 2004). O crescimento somático (g; sensu HALL e BURNS, 2002) das fêmeas foi então calculado por:

$$g = [\ln(l_f) - \ln(l_o)] / \Delta t(\text{dias}^{-1})$$

onde  $l_f$  é o comprimento do corpo final (mm),  $l_o$  é o comprimento inicial (mm) e  $\Delta t$  é o intervalo de tempo (dias).

Os resultados para longevidade, crescimento e fecundidade obtidos nas diferentes soluções-teste foram comparados aos resultados dos controles. Assim, pode-se encontrar a concentração de efeito não observado - CENO e a concentração de efeito observado - CEO. A CENO é definida como a maior concentração da amostra que não causa efeito estatisticamente significativo aos organismos quando comparado ao controle, nas condições de ensaio; e a CEO é definida como a menor concentração da amostra que causa efeito estatisticamente significativo nos organismos quando comparado ao controle, nas condições de ensaio (NBR 13.373, 2003). A CENO e a CEO foram expressas em porcentagem.

### 3.10 Teste de inibição da emissão da luminiscência em *Vibrio fischeri*

O método utilizado para a avaliação da toxicidade aguda com *Vibrio fischeri* foi de acordo com o Manual de Métodos para Avaliação da Toxicidade do Instituto Ambiental do Paraná, o qual é baseado em normas da (ISO 11348-1-2007) e do (DIN 38412-89).

Este ensaio consiste em detectar a concentração do agente-teste que causa inibição na produção de luz naturalmente emitida pela bactéria *Vibrio fischeri*.



Fonte: site [www.corbisimages.com](http://www.corbisimages.com)

**Figura 6.** Bactéria *Vibrio fischeri*

Para a realização do teste, as várias diluições do agente teste foram adicionadas nas suspensões com a mesma quantidade da bactéria, sendo efetuadas medidas de quantidade de luz, antes e após a adição da amostra diluída, em diferentes intervalos de tempo (15 e 30 minutos). A quantidade de luz perdida nas diferentes concentrações do agente teste é calculada. Como representação do resultado que significa a extensão do efeito do agente teste sobre os organismos, utilizou-se o fator de toxicidade para *Vibrio fischeri* (FTbl) no caso de amostras ambientais.

### 3.11 Método de bioensaios de toxicidade aguda com bactérias luminescentes *Vibrio fischeri*

Teste de toxicidade aguda com bactérias luminescentes *Vibrio fischeri*, determinado através do uso do equipamento denominado Microtox® e realizado pela empresa Umwelt.

Todo o procedimento descrito abaixo é de acordo com a Norma técnica da (CETESB L5.227- 2001) denominada “Teste de toxicidade com a bactéria luminescente *Vibrio fischeri*: método de ensaio” valida este método utilizando o sistema Microtox® (CETESB, 2012).

Primeira etapa foi descongelar a solução de reconstituição, a qual estava aliqüotada em frascos contendo 12 mL, e deixá-la no termobloco à temperatura de 15°C por 15 minutos para que ocorresse o equilíbrio térmico.

Na sequência, a amostra bruta foi salinizada com a adição de 0,2 g de NaCl em 10 mL de amostra. Este procedimento se fez necessário, para que o agente-teste proporcionasse condições de vida à bactéria marinha. Em seguida, as diluições da amostra foram realizadas.

Após a estabilização térmica da solução de reconstituição, descongelou-se em banho-maria a temperatura ambiente o frasco contendo 0,1 mL de bactérias e foi adicionado neste 0,5 mL da solução de reconstituição. O frasco foi agitado levemente e deixado no termobloco por 15 minutos. Passado este período, denominado de ressuspensão, a totalidade da suspensão de bactérias do frasco foi transferida para o restante da solução de reconstituição e colocada no termobloco por mais 15 minutos.

Posteriormente, transferiu-se 0,5 mL da suspensão de bactérias para as cubetas de leitura em intervalos de 30 segundos. Ao término de 15 minutos, contados a partir da colocação da suspensão de bactérias na primeira cubeta, iniciou-se a leitura da luminescência das bactérias em intervalos de 30 segundos. A sequência para leitura da bactéria e acréscimo de 0,5 mL da diluição da solução-teste correspondente foi mantida até a última diluição, com o tempo total determinado para esta etapa de 30 minutos. Passado este período, a leitura final da luminescência das bactérias foi realizada em intervalos de 30 segundos. O resultado fornecido foi o menor valor de diluição do agente-teste, onde houve inibição da produção de luminescência menor ou igual a 20% com relação ao controle.

### 3.12 Análises estatísticas

As análises dos dados foram feitas por medidas repetidas ANOVA de uma via, utilizando uma frequência média em ensaio. O nível de significância foi fixado em 5% e com 95% de confiança. A análise estatística foi realizada com o auxílio do programa SPSS versão 14.0 software estatístico (SPSS, Chicago, IL). Para determinação dos valores de CL50 e obtenção dos gráficos foi utilizado o programa SigmaPlot versão 7 da Systat Software Inc.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos na avaliação do impacto ambiental dos resíduos gerados após as seções de hemodiálises e sua caracterização estão descrito a seguir. Como forma de avaliá-lo foram utilizados os testes agudos para *Daphnia magna*, *Euglena gracilis* e *Vibrio fisheri*, bem como determinar a toxicidade ambiental crônica para *Daphnia magna*.

Joinville se caracteriza como uma cidade de médio porte com uma população em torno de 600.000 habitantes e, atualmente, com uma cobertura de tratamento de efluentes urbano de 16,4% de cobertura segunda a Companhia de Saneamento Básico Águas de Joinville. Sua estratégica posição e influência sobre a Baía da Babitonga é causadora do forte impacto ambiental sobre este delicado ecossistema. Uma diminuição dos fatores antrópicos de poluição podem contribuir significativamente sobre a qualidade de vida deste ambiente.

Um fato importante observado, foi que a cobertura de tratamento de efluentes urbano em Joinville não se faz presente, ainda, nos locais que se encontram os hospitais e clínicas que que atende os pacientes nefropatas, portanto todo efluente gerado é lançado *in natura* nos rios que desembocam na Baía da Babitonga.

### 4.1 Caracterização da amostra

Para um paciente submetido a três sessões semanais de diálises, durante quatro horas, utiliza-se 18.000 (dezoito mil) litros de água. Além disso, para cada litro de água utilizável para perfazer o fluído de diálise, até 25% de água que entra no sistema de tratamento de água pode ser enviado para o descarte (SANCHES, 2008). Somados a este volume, segundo o manual de hemodiálise cada paciente gera cerca de 800 mL por minuto de seção de hemodiálise o que gera, por paciente cerca de 48 litros de efluente por hora. O volume de urina gerado por uma pessoa sadia está em torno de 1.500 mL dia. Os principais resultados obtidos na caracterização física e química das amostras coletadas do efluente resultante de hemodiálise estão apresentados na tabela 3.

**Tabela 3** - Resultados da caracterização físico-química dos efluentes resultantes de hemodiálise. A média foi obtida de quatro amostras diferentes obtidas em diferentes dias.

Parâmetros	Média ± DP	Legislação mg/L* (CONAMA nº 430)
OD (mg L <sup>-1</sup> )	10,78 ± 1,45	≥ 4 mg L <sup>-1</sup>
pH	7,49 ± 0,66	6 a 9
Temperatura (°C)	27,91 ± 3,77	40 °C
Condutividade (µS cm <sup>-1</sup> )	4080,25 ± 1811,50	23 a 0,36 µS cm <sup>-1</sup>
Turbidez (ppm)**	4513,00 ± 3270,59	≤ 100 UNT
Salinidade (%)	9,42 ± 4,48	Salobra
DQO (mgO <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> ) ***	832,75 ± 489,00	125 mgO <sub>2</sub> L <sup>-1</sup>
DBO (mgO <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> ) p/ 5 dias	383,75 ± 189,32	10 mgO <sub>2</sub> L <sup>-1</sup>
Dureza (mg L <sup>-1</sup> CaCO <sub>3</sub> )	60,03 ± 4,55	≤ 500 mg/L CaCO <sub>3</sub>
Nitrito	11,56 ± 22,96	1,0 mg L <sup>-1</sup>
Nitrato	1,52 ± 2,33	10,0 mg L <sup>-1</sup>
Fosfato	53,95 ± 21,72	0,15 mg L <sup>-1</sup> P
Sílica	98,28 ± 92,07	Sem parâmetros
Sulfato	23,00 ± 23,47	250 mg L <sup>-1</sup> SO <sub>4</sub>
Nitrogênio Total	126,76 ±	13,3 mg L <sup>-1</sup> N, para pH ≤ 7,5

\* Valores de referência para águas de classe 3

\*\* 1 unidade de turbidez nefelométrica (NTU) = 7,5 ppm de SiO<sub>2</sub>

\*\*\* Valor máximo permitido de acordo da Licença de Operação do Instituto Ambiental do Paraná – IAP.

Tendo a resolução 430 do CONAMA (2011) como referência, observa-se que a amostra se caracteriza nos padrões mínimos estabelecidos pela legislação vigente. Os resultados obtidos, em termo da caracterização físico-química da amostra, apresentaram uma condutividade 177 vezes maior do que o estabelecido pelo CONAMA e, em termos de salinidade, a amostra se classifica como salobra. Da mesma forma, a turbidez foi 45 vezes superior, sendo o principal componente desta turbidez a presença de sílica (98,28 ± 92,07 mg/L). A DBO que é a quantidade de oxigênio necessária para oxidar a matéria orgânica biodegradável presente na água apresenta o valor em torno de 38 vezes superior a atual legislação. A Demanda Química de Oxigênio (DQO), um parâmetro que mede a quantidade de matéria orgânica suscetível de ser oxidada, por meios químicos que existam em uma amostra líquida, apresentou valor em torno de 6,6 vezes superior ao mínimo preconizado.

A amostra apresentou uma concentração de nitrito em torno de 11 vezes superior, porém para nitrato e pH se encontra dentro dos parâmetros exigidos. A determinação da concentração de fosfato, apesar de não ser contemplada na resolução 430 do CONAMA (2011) se faz necessária por ser um dos principais nutrientes para crescimento de cianobactérias. A presença de alta concentração de sílica (valor referencial em água potável 1 a 30 mg/L) é caracterizada como um componente de suspensão. A resolução acima descrita, estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes e prevê que o efluente possua a ausência de materiais flutuantes. Outro componente que apresentou valor superior ao preconizados para as águas de classe 3 foi o nitrogênio total com 10 vezes acima do limite permitido.

#### 4.2 Avaliação da toxicidade ambiental aguda

Para a determinação toxicologia ambiental de forma aguda foi realizado o experimento empregando o microcrustáceo de água doce, *Daphnia magna*, pela microalga *Euglena gracilis* e pela bactérias luminescentes *Vibrio fischeri*.

A legislação preconizada de Fundação do Meio Ambiente (FATMA), em Santa Catarina para Esgotos domésticos e/ou hospitalares em conformidade com o disposto na Portaria 017/02, relativo ao padrão de qualidade, estabelece que o fator de diluição destas amostras para o microcrustáceo *Daphnia magna* sendo como fator 1 e para a bactéria *Vibrio fisheri* como fator 4 (FATMA, 2002).

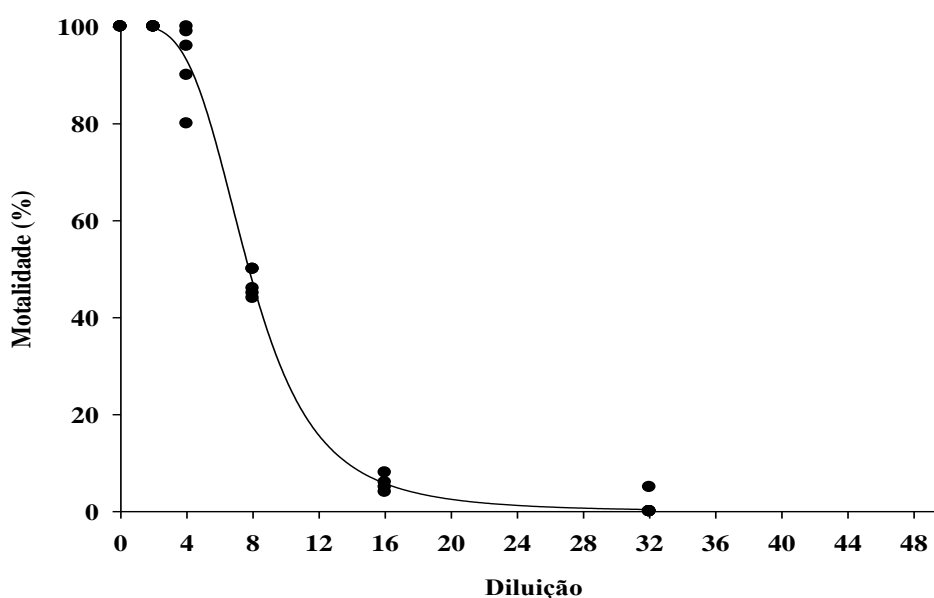
Os testes realizados com a bactéria *Vibrio fisheri* não foram conclusivos, uma vez que se obteve fator de diluição 1. Esse fato pode ser justificado em função da necessidade que a metodologia possui de salinizar as amostras, uma vez que essa bactéria é de origem marinha. As amostras analisadas apresentavam em torno de 9% de salinidade.

##### 4.2.1 Sensibilidade dos organismos-teste

A CE50 24h média para a substância de referência (dicromato de potássio) foi de 0,68 mg/L para o período de abril a dezembro de 2012, o que assegura a credibilidade dos testes desenvolvidos, pois a sensibilidade do cultivo esteve dentro

do recomendado pelas normas internacionais, entre 0,6 e 1,7 mg/L (ISO 6341: 1996).

Os resultados obtidos nas análises com as diferentes concentrações do efluente coletado na máquina de hemodiálise a toxicidade ambiental aguda para a *Daphnia magna* foi o fator de diluição 7,72 mg/L, conforme observado na figura 7.



**Figura 7.** Número de filhotes por dia (média) das *Daphnia magna* exposto a diferentes concentrações % de efluentes de hemodiálises. CE50 = 7,72 ± 3,46 diluição,  $p < 0,0001$ .

Ao contrário dos outros sistemas de plantas a alga unicelular ciliado *Euglena gracilis* tem uma relação ligeiramente diferente da gravidade. Para a fotossíntese adequada, *E. gracilis* precisa permanecer perto da superfície de uma coluna de água. A resposta mais evidente, portanto, seria o de luz, e que exibem forte intensidade. No entanto, como a luz não é contínua ao longo de um ciclo de 24 h, a gravidade também é um estímulo importante para *E. gracilis* permanecer perto da superfície. Para esse efeito que a *E. gracilis* exibe uma resposta de gravitaxia negativa. Os resultados estão descritos nas figura 8 a 12 e na tabela 4.

A orientação de gravitaxia é dada pelo valor do r-value das células. Segundo Azizullah *et al.* (2011), esta resposta é comumente encontrada para mostrar uma resposta muito pronunciada a toxicidade de efluentes. O r-value foi o parâmetro mais afetado e mostrou comprometimento superior de 2,42 com relação a inibição



da motilidade, 3,03 em relação a inibição do movimento ascendente, 6,64 maior que inibição da compacidade e 3,55 vezes maior que a inibição do alinhamento.

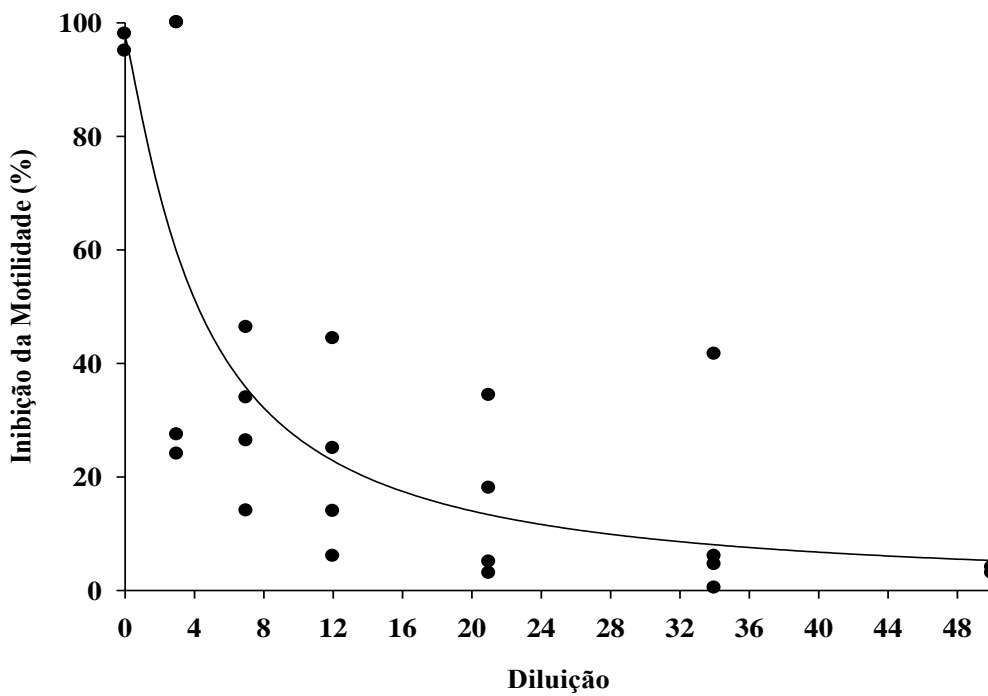
Outros dois fatores também avaliam a inibição da orientação gravitacional das *E. gracilis*, com menor intensidade que são os movimento ascendente e o de alinhamento (HODA e HÄDER, 2010). A consequência desta toxicidade dos efluentes de hemodiálises acarretariam numa perda das algas *Euglena gracilis* que se orientam em direção a luz acarretando uma menor capacidade de fotossíntese, o que provavelmente levaria a morte por falta de energia bioquímica.

A compacidade é dada pelo fator de forma que é usado para distinguir objetos redondos dos alongados. Segundo Tahedl e Häder (1999) quanto mais redonda for a célula, menor será a capacidade de natação das algas. Este parâmetro foi o que apresentou a menor toxicidade ao ponto de não ser possível identificar mudanças nas variáveis de velocidade média, superior e lateral, as quais não chegaram a apresentar toxicidade pelas amostras de efluentes estudados.

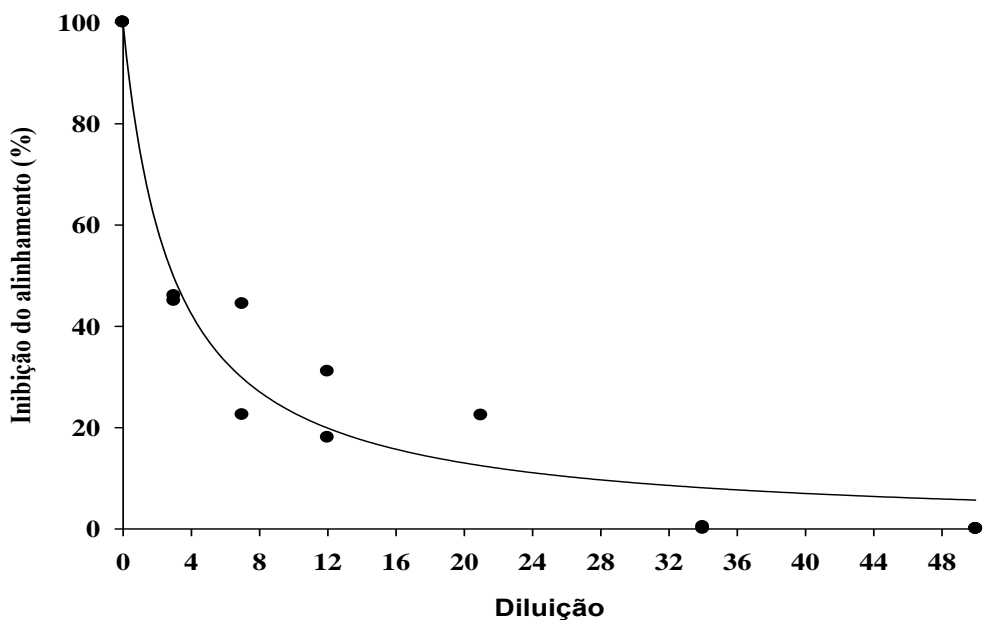
**Tabela 4.** Resultados médios das inibições percentuais e do valor de CL50 dos testes agudos obtidos com a alga *Euglena gracilis*.

Inibição (%)	CL <sub>50</sub> (diluição)	P
Motilidade	5,83 ± 2,34	<0,0001
Movimento ascendente	3,48 ± 3,00	<0,0001
r-vaule	12,93 ± 5,83	<0,0001
Compacidade	8,63 ± 5,21	<0,0001
Alinhamento	4,52 ± 6,70	<0,0001
<b>Média</b>	<b>7,08 ± 3,40</b>	

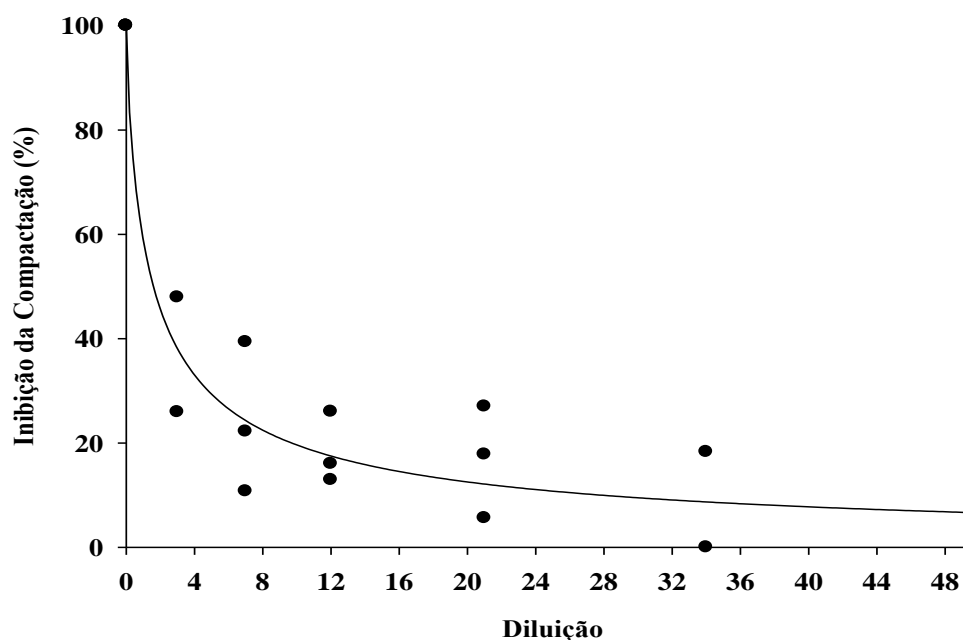
p\* = ANOVA one-way, nível de significância p < 0,05, 95% confiança.



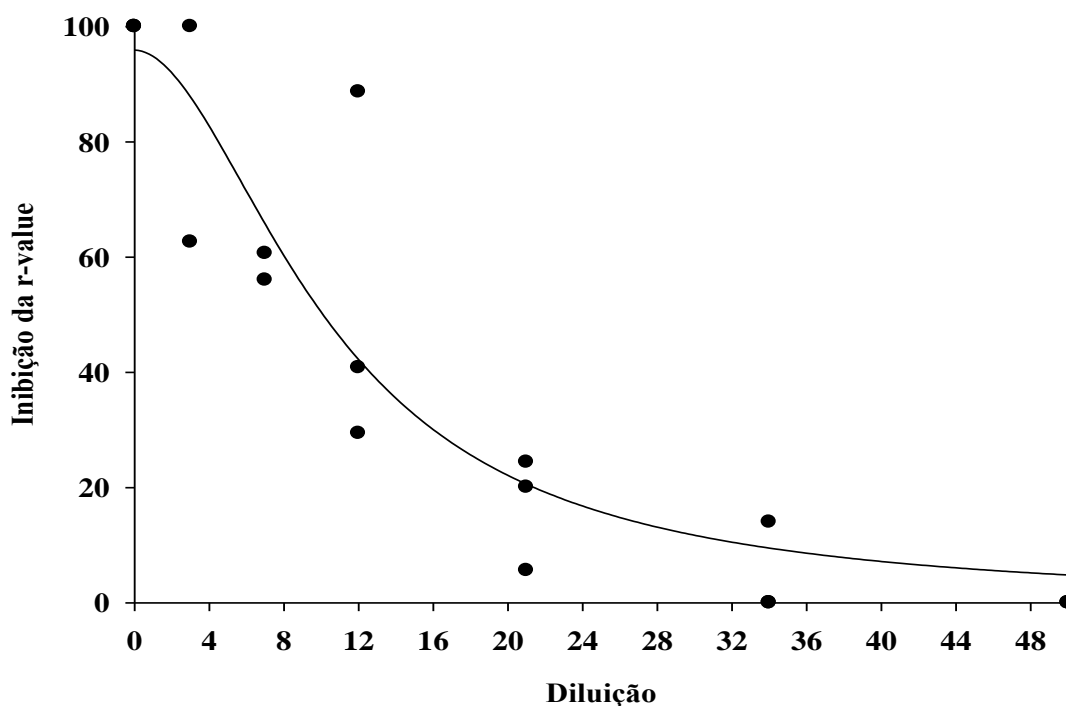
**Figura 8.** Inibição percentual da motilidade de *Euglena gracilis* exposto a diferentes concentrações % de efluentes de hemodiálises. CE50 = 5,83 ± 2,34 diluição, p = <0,0001.



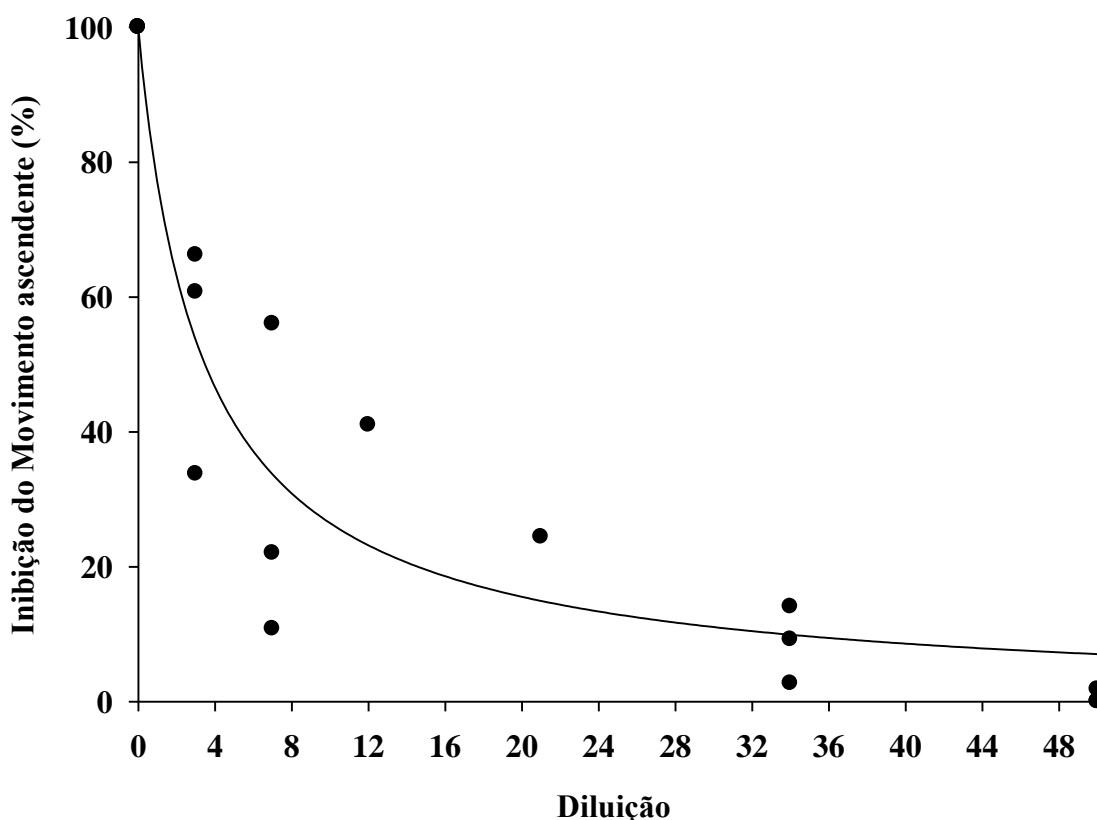
**Figura 9.** Inibição percentual do alinhamento da *Euglena gracilis* exposto a diferentes concentrações % de efluentes de hemodiálises. CE50 = 4,52 ± 6,70 diluição, p = <0,0001.



**Figura 10.** Inibição percentual da compactação da *Euglena gracilis* exposto a diferentes concentrações % de efluentes de hemodiálises. CE50 = 8,63 ± 5,21 diluição,  $p = <0,0001$ .



**Figura 11.** Inibição percentual do r-value da *Euglena gracilis* exposto a diferentes concentrações % de efluentes de hemodiálises. CE50 = 12,93 ± 5,83 diluição,  $p = <0,0001$ .



**Figura 12.** Inibição percentual movimento ascendente da *Euglena gracilis* exposto a diferentes concentrações % de efluentes de hemodiálises. CE50 = 3,48 ± 3,00 diluição,  $p < 0,0001$ .

#### 4.3 Testes crônicos

Para o desenvolvimento do teste crônico com *Daphnia magna* foi estabelecido como parâmetro de referência aos dados obtidos no ensaio agudo aonde foi determinado que a concentração letal (CL50) foi obtida para uma diluição de 7,7 vezes. A partir deste dado foram realizados os ensaios em 10 réplicas com concentrações variando de zero (controle), 1%, 5%, 10%, 25% e 50% de efluentes. Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 5 e nas figuras 13 a 21. Nas concentrações acima de 25% não houve a formação de descendente devido as matrizes não sobreviverem em função da toxicidade da amostra.

Nos ensaios crônicos a concentração mais alta da amostra que não causa efeito estatisticamente significativo aos organismos quando comparado ao controle, em termo de fecundidade (CENO), nas condições de ensaio foi de 3,70%; e a

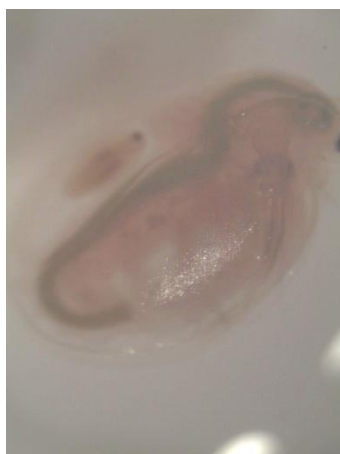
menor concentração da amostra que causa efeito estatisticamente significativo nos organismos quando comparado ao controle, também em termo de fecundidade nas condições de ensaio foi de 18,75% (CEO)(NBR 13.373, 2003).

**Tabela 5.** Número médio de filhotes por dia (média) de *Daphnia magna* expostos a diferentes concentrações % de efluentes de hemodiálises. Cada ponto corresponde a dez *Daphnias magna*.

Amostras	Número médios de filhotes por dia	<i>p</i>
<b>Controle</b>	9,93 ± 4,88	
<b>1%</b>	17,30 ± 3,34	0,4332
<b>5%</b>	31,80 ± 6,62	0,1152
<b>10%</b>	13,36 ± 1,00	0,4652
<b>25%</b>	0,0 ± 0,0	0,0268
<b>50%</b>	0,0 ± 0,0	0,0268

*p*\* = ANOVA one-way, nível de significância *p* < 0,05 - 95% confiança.

Com intuito de determinar o crescimento somático das fêmeas de *Daphnia magna*, após o tratamento com o efluente da hemodiálise nas diluições administradas, registrou-se as figuras numeradas de 13 a 17, as quais seguem minuciosamente detalhadas.



Fonte: Machado, Carla Keite

**Figura 13.** *Daphnia magna* – Controle – Réplica 1

Imagem capturada no 21º dia, apresenta a *Daphnia magna* medindo 5,56 mm em seu comprimento, suas membranas são visíveis, espessa e brilhosa; o trato

digestivo apresenta-se espesso, a cor verde evidenciando nitidamente a presença de clorofila, ocorrendo assim a digestão de microalgas; Na bolsa, observa-se na um filhote prestes a ser expulso dela.



Fonte: Machado, Carla Keite

**Figura 14.** *Daphnia magna* – Diluição 1% – Réplica 1

Imagem capturada no 21º dia, apresenta a *Daphnia magna* medindo 4,56 mm em seu comprimento, suas membranas são visíveis e espessa; o trato digestivo na cor verde evidenciando nitidamente a presença de clorofila, devido à digestão de microalgas. Na bolsa, não observa-se a presença de nenhum filhote ou ovo em desenvolvimento na bolsa.



Fonte: Machado, Carla Keite

**Figura 15.** *Daphnia magna* – Diluição 5% – Réplica 4.

Imagem capturada no 21º dia, apresenta a *Daphnia magna* medindo 6,25 mm em seu comprimento, suas membranas visíveis, espessas e brilhosa; o trato

digestivo apresentando-se na cor verde escuro nitidamente percebe-se a presença de clorofila, devido a digestão de microalgas. Na bolsa, observa-se a presença de quatro ovos de cor verde escuro. A aparência desta *Daphnia magna* está muito sadia, em relação aos demais exemplares, tratados em diluições diferentes.



Fonte: Machado, Carla Keite

**Figura 16.** *Daphnia magna* – Diluição 10% – Réplica 3.

Imagem capturada no 21<sup>o</sup> dia, apresenta a *Daphnia magna* medindo 4,64 mm em seu comprimento, suas membranas visíveis, fina e opaca; o trato digestivo evidenciando a digestão de microalgas, porém parte do mesmo apresenta a cor cinza, uma característica evidenciada apenas neste exemplar; Na bolsa, não se observa a presença de ovos ou filhotes.

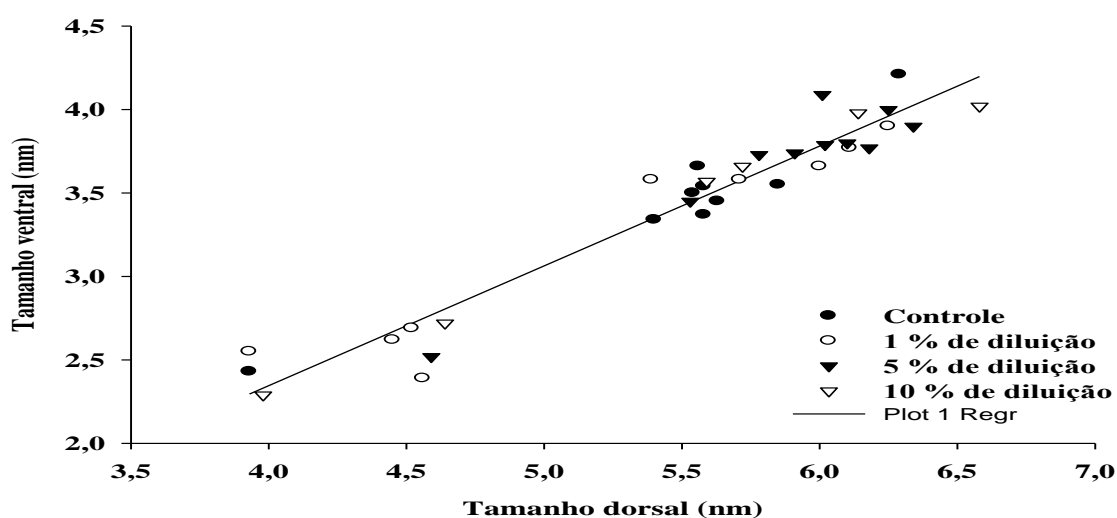


Fonte: Machado, Carla Keite

**Figura 17.** *Daphnia magna* – Diluição 10% – Réplica 9.

Imagem capturada no 21º dia, apresenta a *Daphnia magna* medindo 5,72 mm em seu comprimento, suas membranas pouco visíveis, fina e opaca; o trato digestivo apresentando-se na cor amarela. Na bolsa, observa-se a presença de três ovos na cor cinza claro, aparentemente podemos observar a fragilidade desta *Daphnia magna* em relação aos demais exemplares apresentados em diluições diferentes.

Estudos ecotoxicológicos com *Daphnia magna* viva, frequentemente, avaliam o crescimento individual dos organismos. Segundo Pereira *et al* (2004) estas medidas sobre os organismos vivos devem ser evitadas, uma vez que podem levar a sua morte ou afetação, portanto, restringi-se os resultados. Deste modo, e considerando-se que as Daphnias vivas foram utilizadas ao longo do seu ciclo de vida, as medidas sobre a muda são preferidos em quase todos os estudos. Assim, o estabelecimento das relações alométricas foi uma estimativa viável de parâmetros de crescimento. O comprimento ventral e dorsal das *Daphnia magna* vivas foram registrados ao final dos testes crônicos em todas as amostras, com demonstra a figura 18. A análise de regressão foi aplicado a fim de estabelecer a relação entre as duas medições alométricas em cada espécie. Como altos valores de R-quadrado foram alcançados, a equação obtida demonstrou que o efluente resultante das hemodiálises não causou mudanças fisiológicas decorrentes de sua toxicidade até 10% de diluição. As concentrações acima de 25% causaram a morte precoce das fêmeas.

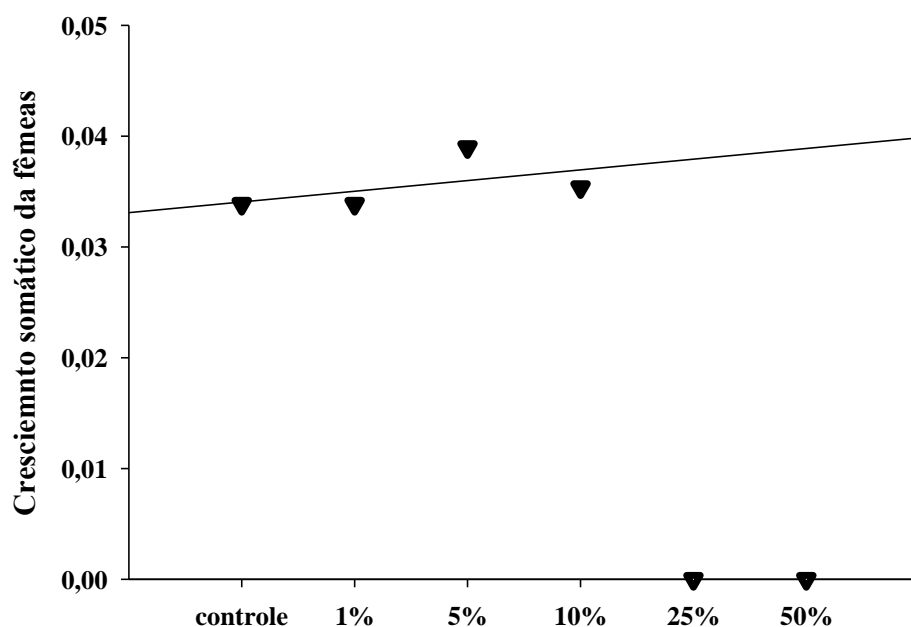


**Figura 18.** Relações alométricas entre o tamanho ventral e o dorsal das *Daphnias magna* ao final dos experimentos do controle, 1, 5 e 10%.  $R^2 = 0,9317$ ,  $Y = 0,717698x + 0,5250$ .



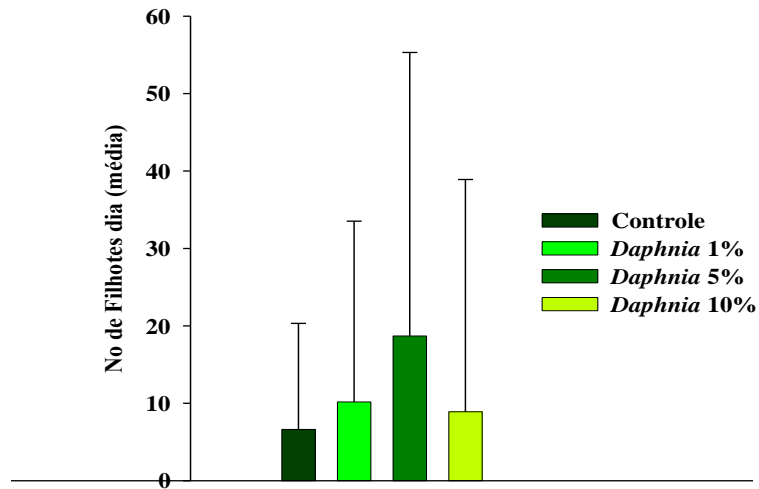
Através dos dados apresentados na figura 18, observou-se que até a concentração de 10% de efluentes não houve uma resposta fisiológica tóxica sobre a forma da *Daphnia magna*. Este fato é pertinente aos obtidos através da determinação do CENO e CEO.

Outra técnica que foi utilizada para a verificação da toxicidade sobre a capacidade das fêmeas gerarem filhotes foi a determinação do crescimento somático descrito por Pereira *et al* (2004). Através da figura 19, pode-se observar que a reta obtida permanece em ascendente até a diluição de 10%, o que comprova que as fêmeas de Daphnias não apresentam respostas fisiológicas frente a toxicidade dos efluentes estudados. Os dados do CEO (18,75%) obtidos estatisticamente comprovam esses dados.

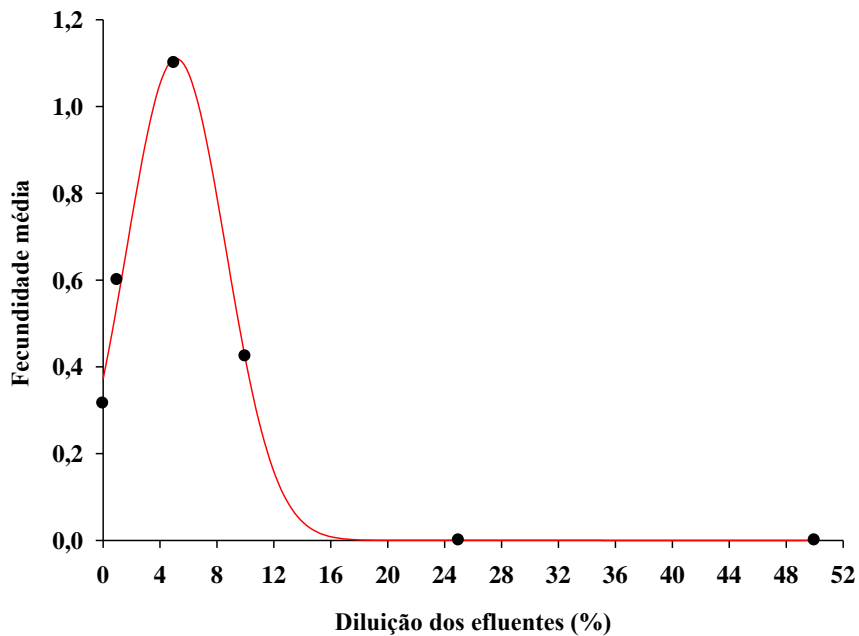


**Figura 19.** A história de vida no ponto final das *Daphnias magna* exposto a diferentes concentrações % de efluentes de hemodiálises. Cada ponto corresponde à média de dez *Daphnias magna*.

As figuras 20 e 21 apresentam os resultados sobre a fecundidade média e o número de filhotes médios obtidos em todos os testes. Apesar de instabilidade na geração de descendentes obtidos através de 10 repetições para cada amostra em termo de desvio padrão pode se observar quea nos testes crônicos a CL<sub>50</sub> 7,74 de diluição se aproxima da diluição, na qual se obteve a máxima fecundidade média.



**Figura 20.** Número de filhotes por dia (média) das *Daphnias* spp. exposto a diferentes concentrações % de efluentes de hemodiálises. Cada ponto corresponde a dez *Daphnias magna*.



**Figura 21.** Número de filhotes por dia (média) das *Daphnias magna* exposto a diferentes concentrações % de efluentes de hemodiálises.

## CONCLUSÃO

Com referência a resolução do CONAMA 430 (2011) que a condutividade, turbidez, salinidade e demanda bioquímica de oxigênio (DBO<sub>5,20</sub>) caracterizaram a amostra como tóxica.

A demanda química de oxigênio (DQO), segundo o valor máximo permitido de acordo com a Licença de Operação emitida pelo Instituto Ambiental do Paraná – IAP se encontra elevado.

Os compostos químicos como os nitritos, fosfatos, sulfatos, amônia e nitrogênio total se encontram em valores superiores dos parâmetros tendo como referência a resolução 430 do CONAMA.

As amostras de efluente de hemodiálise apresentaram grau de toxicidade ambiental agudo para as microalgas *Euglenas gracilis* em quatro parâmetros fisiológicos diferentes (motilidade, r-value, compacidade, movimento ascendente e alinhamento), sendo o principal efeito uma alteração na gravitaxia negativa.

O grau de toxicidade ambiental agudo das amostras para a *Daphnia magna* de 7,74 como fator de diluição, apresentando-se um valor superior ao preconizado na Portaria do FATMA 017/2002 e crônico através da determinação do CENO (3,70% fator de diluição) e do CEO (18,75% fator de diluição) sem efeito estatisticamente significativo.

Para o teste toxicológico agudo com *Vibrio fisheri* foi de 1 o fator de diluição, permanecendo dentro do valor preconizado na Portaria do FATMA 017/2002 .

## REFERÊNCIAS

ABES. Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental. Disponível em: <<http://www.abes-sc.org.br/novosite/>>. Acesso em: 10 out. 2012.

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12.713: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia* spp. (Cladocera, Crustacea)**. Rio de Janeiro, 2003a.

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 13.373: Ecotoxicologia Aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com *Ceriodaphnia* spp. (Crustacea, Cladocera)**. Rio de Janeiro, 2003b.

Agar J. W. M.; Wilson S.; Magoffin J.; Knight R. Somerville CA: Recycling reject water: A new essential for all facility-based dialysis services. **Nephrology** (Carlton) n. 12. p.1012, 2007.

AHMED, H. A.; A. M. **Bio-Monitoring von Aquatischen Ökosystemen**. Erlangen-Nürnberg, Germany, 2010. Doctor Thesis, Friedrich-Alexander University (FAU).

ARAGÃO, M. A.; ARAÚJO, R. P. A. Métodos de ensaios de toxicidade com organismos aquáticos. *In*: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. (Eds.) **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações**. 2. ed. São Carlos: RIMA. p.117-152. 2008.

ARAÚJO, R. P. A.; ARAGÃO, M. A. Testes de toxicidade com organismos aquáticos. *In*: **Métodos de avaliação da toxicidade de poluentes a organismos aquáticos**. CETESB (Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental), Cursos e Treinamentos. v. 1, 2007.

AUBREY, D. Biology (BIMM) 101 Lab Manual. p. ii. AS Soft Reserves, Winter 2007. Hoi Ho, Thong Huy Do, Tony Tran Ho, k Lee. "**Vibrio infections**". Disponível em: <<http://www.emedicine.com/med/topic2375.htm>> Acesso em: 20 jul. 2012.

AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. da M. **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. São Carlos, p.340, RIMA, 2003.

AZIZULLAH, A.; RICHTER, P. R.; HÄDER, D-P. **Responses of morphological, physiological, and biochemical parameters in *Euglena gracilis* to 7-days exposure to two commonly used fertilizers DAP and urea.** v.24, n.1, p.21-33. 2011.

AZUR Environmental. **Manual Microtox Acute Toxicity Test.** 1998, Disponível em: <[http:// www.coastalbio.com/images/Acute\\_Overview.pdf](http://www.coastalbio.com/images/Acute_Overview.pdf)> Acesso em: 20 jul. 2012.

BATALHA, B. I.; PARLATORRE, A. C. **Controle da qualidade da água para consumo humano: bases conceituais e operacionais.** São Paulo: CETESB, 1998.

BEM, C. C. **Determinação do estado de eutrofização de um lago raso: estudo de caso do Lago Barigui – Curitiba, 2009.** Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná (UFPR).

BOHRER, M. B. **Biomonitoramento das lagoas de tratamento terciário do sistema de tratamento dos efluentes líquidos industriais (SITEL) do pólo petroquímico do sul, Triunfo, RS, através da comunidade zooplanctônica.** São Paulo,1995. p.469. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 50, de 21 de fevereiro de 2002. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para planejamento, programação, elaboração e avaliação de projetos físicos de estabelecimentos assistenciais de saúde. Disponível em: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2002/res0050\\_21\\_02\\_2002.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2002/res0050_21_02_2002.html). Acesso em: 12 jan. 2013.

BRASIL. CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE - Resolução CONAMA nº 430, de 13 de maio de 2011 - Dispõe sobre condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=646>. Acesso em: 22 fev. 2013.

BRASIL. Projeto Programa de Pesquisas em Saneamento Básico (**PROSAB**). Tratamento de água para abastecimento por filtração direta. Rio de Janeiro: ABES, RIMA, 2003.

BREITER, R.; RICHTER, P.; HADER, D. P.; NEESSE, T.; TURECK, C. R.; OLIVEIRA, T. M. N. Untersuchungen an Kontaminierten Sedimenten der Baía da Babitonga. *In: Zur Landschaftsökologie der Baía da Babitonga: ein brasilianisch - bayerisches Modellprojekt.* ed. Erlanger : Fridrich- Alexander- Universität Erlanger Nürnberg, v.27, p. 59-71. 2004.

BRENTANO, D. M. **Desenvolvimento e aplicação do teste de toxicidade crônica com *Daphnia magna*: avaliação de efluentes tratados de um aterro sanitário.** Florianópolis, 2006. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Santa Catarina (UFSC).

CAIRNS, J. R. J.; DICKSON, K.L. Estimating hazard of chemicals substances to aquatic life. Philadelphia. A.S.T.M. **Special Technical Publication**, n. 657, 1980.

CETESB. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. **Água – Teste de toxicidade aguda com *Daphnia similis* Claus, 1876 (*Cladocera, Crustácea*).** Norma CETESB – L5.018. São Paulo: 1994.

CETESB. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Roteiro de testes de toxicidade aguda com *Daphnia similis*. *In: Métodos de avaliação da toxicidade de poluentes a organismos aquáticos.* São Paulo, 2007.

CETESB. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. **Teste de toxicidade com a bactéria luminescente *Vibrio fischeri*: método de ensaio.** Dez, 2001. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br/userfiles/file/servicos/normas/pdf/L5227.pdf>>. Acesso em: 20 jul. 2012.

CIAMPO, Lineu Fernando ECOTOX: Medidas em ecotoxicologia e procedimentos experimentais com toxinas simples: uma experiência transdisciplinar. *In: 2º Seminário Integrado de Ensino, Pesquisa e Extensão, 2006, Joinville. II SIEPE - Anais de Resumos.* Joinville: UNIVILLE, p.34 – 34. 2006.

COMPANHIA ÁGUAS DE JOINVILLE – Disponível em: [http://www.aguasdejoinville.com.br/esgoto\\_ampliacao.php](http://www.aguasdejoinville.com.br/esgoto_ampliacao.php). Acesso em: 22 dez. 2012.

CONFORTI V., ALBERGHINA J. URDA e.g. Structural changes and dynamics of phytoplankton community along a highly polluted river of Argentina (Matanza-Riachuelo). **Journal of Aquatic Ecosystem Health**. n.4, p. 59-75. 1995.

CONFORTI V. Study of the Euglenophyta from Camaleão lake (Manaus- Brazil). III. *Euglena* Her., *Lecpocninchis* Perty, *Phacus* Duj. **Revue d'Hydrobiologie tropicale**. n. 27. V.1. p. 3-21, 1994.

CHECCUCCI, A.; COLOMBETTI, G.; FERRARA, R.; LENCI, F. Action spectra for photoaccumulation of green and colorless *Euglena*: evidence for identification of receptor pigments. **Photochemistry and Photobiology**, n. 23, p.51-54, 1976.

DATASUS, Joinville, 2012. Disponível em: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php>. Acesso em: 20 jul. 2012.

DEOUX, P.; DEOUX, S. **Ecologia é a saúde**: O impacto da deteriorização do ambiente na saúde. Lisboa: Instituto Piaget, 1996.

DIN - DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG. **DIN 38412**: testverfahren mit Wasserorganismen (gruppeL) Bestimmung der nicht akut giftigen Wirkung von Abwasser gegenüber Daphnien über Verdünnungsstufen. 1989.

ECOTOX 4.0. **Automatic Toxicity Monitoring Manual**, Real Time Computer, 2001.

EMMANUEL, E.; PERRODIN, Y.; KECK, G.; BLANCHARD, J. M.; VERMANDE P. Ecotoxicological risk assessment of hospital wastewater: a proposed framework for raw effluents discharging into urban sewer network. **Journal of Hazardous Materials**. n.117. 2005.

EMMENS, C. W. W., The dose-response relation for certain principles of the pituitary gland, and of the serum and urine of pregnancy. **J. Endocrinol**. n.2, p.194–225. 1940.

ESKINAZI-LEÇA, Enide; NEUMANN-LEITÃO, Sigrid; COSTA, Mônica Ferreira da (Organizador). **Oceanografia**: um cenário tropical. Recife: Bagaço, p.761. 2004.

ERZINGER, G. S.; CIAMPO, L. F.; HÄDER, D-P. Equipamento e processo para análise de toxicidade em ambientes aquáticos. **Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI)**, Brasil. PI1102317-1. 2010.

FATMA. Fundação do Meio Ambiente. **Portaria nº 017/02**. Estabelece os limites máximos de toxicidade aguda para efluentes de diferentes origens e dá outras providências. 2002.

FENT, K.: **Ökotoxikologie**. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1998.

FONSECA, A. L. **A biologia das espécies *Daphnia leavis*, *Ceriodaphnia dubia silvestri* (Crustacea, Cladocera) e *Poecilia reticulata* (Pisces, Poeciliidae) e o comportameto destes em testes de toxicidade aquática com efluentes industriais**. 1991. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR).

GARTISER, St., BRINKER, L., ERBE, T., KÜMMERER, K. & WILLMUND, R., (1996). Belastung von Krankenhausabwasser mit gefährlichen stoffen imsinne § 7a WHG. **Acta Hydrochim. Hydrobiol.**, nº 24, v.2, p.90-97, 1996.

GOETSCH, G. P.; LORENZI, L.; BRUMMER, R.; TURECK, C. R.; OLIVEIRA, T. M. N. Macrofauna bentônica em dois bancos lodosos de *Mytella charruana* na baía da Babitonga (Santa Catarina, Brasil). *In: Caderno de Iniciação à Pesquisa*. ed.Joinville : Editora da Univille, v.8, p. 93- 100. 2006.

GIODA, A.; GOMES, F. M.; SERAFIM, H. Análise de poluentes nos sedimentos e na água do rio Cachoeira e sua influência sobre o meio ambiente. *Revista Saúde e Meio Ambiente (Joinville)*. **Health And Environment Journal**, v.1, n.1, p.29-35. 2000.

GUILLARD, R. R. L.; RYTHER, J.H. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana hustedt* and *Detonula convervacea* (Cleve) Gran. **Can. J. Microbiologia**. n.8, p.229–239. 1962.



HÄDER, D-P.; GRIEBENOW, K. Orientation of the green flagellate, *Euglena gracilis*, in a vertical column of water. **FEMS Microbiology Ecology**, n. 53, p.159-167, 1998.

HÄDER, D-P.; LEBERT, M. Real time computer controlled tracking of motile microorganisms. **Photochemistry and Photobiology**, v. 42, p. 509-514. 1985.

HÄDER, D-P.; VOGEL, K. Graviorientation in photosynthetic flagellates. **ESA SP** 307, p.521-526, nov. 1990.

HÄDER, D-P.; LIU, S. Motility and gravitactic orientation of the flagellate, *Euglena gracilis*, impaired by artificial and solar UVB radiation. **Currence Microbiology**, n. 21, p.161-168, 1990.

HÄDER, D-P.; VOGEL, K.; SCHDFER, J. Responses of the photosynthetic flagellate, *Euglena gracilis*, to microgravity. **Microgravity Science Technology III**, n. 2, p.110-116, 1990.

HALL, C. BURNS, C.W. Mortality and growth responses of *Daphnia carinata* to increases in temperature and salinity. **Freshwater Biology**. N 47, p.451 – 458. 2002.

HAMILTON, M. A.; RUSSO, R. C.; THURSTON, R. V. Trimmed Spearman- Karber metod for calculation of EC50 and LC50 values in bioassais. **Burlington research inc. fci. tecnol.** n. 11, v. 7, p. 114-119. 1977.

HENRY, R.; TUNDISI, J.G.; CURI, P.R. Fertilidade Potencial em Ecossistemas Aquáticos: Estimativa através de Experimentos de Eutrofização Artificial. **Ciência e Cultura**. v. 35, n. 6, p. 789-800. 1983.

HODA, A, HÄDER, P-D. Rapid ecotoxicological bioassay of nickel and cadmium using motility and photosynthetic parameters of *Euglena gracilis*. **Environmental and Experimental Botany**. Erlagen. Germany. n. 69, p. 68-75. 2010.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA: Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/>> Acesso em: 10 set. 2012.

ISO - INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION. **ISO 6341**: water quality – Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna Straus* (Cladocera, Crustacea). USA, 1996.

ISO – INTERNACIONAL STANDARD ORGANIZATION. ISO 11348: Describes three methods for determining the inhibition of the luminescence emitted by the marine bacterium *Vibrio fischeri*. USA, 2007.

JOINVILLE - **Cidade em dados 2010 -2011**, SCHIESSL, R. N. Fundação IPPUJ, p.184. 2011.

KEGG GENOME. *Vibrio fischeri* Genome Information. Disponível em: <[http://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_organism?org=vfi](http://www.genome.jp/kegg-bin/show_organism?org=vfi)> . Acesso em: 06 out. 2011.

KLISCH, M, R. P.; SINHA, E. W.; HELBLING & D.P. Häder/Induction of thymine dimers by solar radiation in natural freshwater phytoplankton assemblages in Patagonia, Argentina. **Aquat. Sci.** n. 67, p.72-78. 2005.

KUHN, R. M. **Optimization of the ECOTOX system for saline water**. Erlangen, Germany, 2004.

KUMMERER, K.; HELMERS, E.; HUBNER, P.; MASCART, G.; MILANDRI, M.; REINTHALER, F.; ZWAKENBERG, M. European hospitals as a source for platinum in the environment: emissions with e.uents-concentrations, amounts and comparison with other sources. **Sci. Total Environ.** n. 225, p.155 -165. 1998.

LEPRAT, L. *Les rejets liquides hospitaliers, quels agents et quelles solutions techniques?* **Revue Techniques hospitali`eres** 632, 49–52p.1998. Disponível em: <http://www.bvsde.paho.org/bvsaidis/mexico26/xii-ii-001.pdf>, Acesso em: 20 set 2012.

MACEDO, J. A. B de. **Introdução a Química Ambiental** (Química e Meio Ambiente e Sociedade). 1 ed. Juiz de Fora: Jorge Macedo, 2002.

Manual de Diálise – **Nefrologia HGV-PI**. Disponível em: <[http://www.hgv.pi.gov.br/download/201204/HGV25\\_43447dbcff.pdf](http://www.hgv.pi.gov.br/download/201204/HGV25_43447dbcff.pdf)> Acesso em: 20 fev. 2012.

Manual de boas práticas para hemodiálise. Disponível em: <[http://gid.min-saude.pt/publicacoes/le/manual\\_boas\\_praticas\\_hemodialise.pdf](http://gid.min-saude.pt/publicacoes/le/manual_boas_praticas_hemodialise.pdf)> Acesso em: 30 maio. 2012.

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

MARTINS, M.; CESARINO, C. B. **Revista Latino-Americana de Enfermagem** setembro-outubro; v.13(5). p.670-6, 2005. Disponível em: <[www.eerp.usp.br/rlae](http://www.eerp.usp.br/rlae)>. Acesso em: 25 set. 2012.

MICROBEWIKI. ***Vibrio fischeri* NEU 2011**. Disponível em: <[http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Vibrio\\_fischeri\\_NEU20112011](http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Vibrio_fischeri_NEU20112011)> Acesso em: 06 dez. 2011.

MILLÁN DE KUHN, R.; STREB, C.; BREITER, R.; RICHTER, P.; NEEBE, T.; HÄDER, D-P. Screening for unicellular algae as possible bioassay organisms for monitoring marine water samples. **Water Research**, n. 40, p. 2695-2700. 2006.

MOTA, SUETÔNIO. **Introdução à engenharia ambiental**. 1 ed. Rio de Janeiro: ABES, 1997.

NEALSON K. H.; Hastings J. W. Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance **Microbiol Rev.** n 43, v.4, p.496-518. 1979.

NYHOLM, SV. Cover Photo — August 29, 2000, 97 (18). **Proceedings of the National Academy of Sciences**. Disponível em: <http://www.pnas.org/content/97/18.cover-expansion>. Acesso em: 05 mar. 2012.

OLIVEIRA, T. M. N.; TURECK, C. R.; BASSFELD, J.; FARIA, J.; BRASIL, K., TORRENS, B. M. O. Integridade Ambiental da Baía da Babitonga: Características

Físico-químicas, Microbiológicas e Ecotoxicidade. *In: Diagnóstico Ambiental da Baía da Babitonga*. 1 ed. Joinville: Editora Univille. p. 20-80. 2006.

PEGORARO, Leandro Andrade. Validação de metodologia analítica aplicada ao controle da qualidade de água para hemodiálise para fins de credenciamento junto ao Inmetro. **Projeto Hemotec II**. Curitiba: Tecpar; Finep, 2005.

PEREIRA, G. R.; CIAMPO, L. F.; AMORIN, C. H. Efeitos da radiação ultravioleta e de toxinas na dinâmica do fitoplâncton da Baía da Babitonga. *In: Seminário de iniciação científica*, 11 ed. Joinville : Editora Univille. p. 25. 2006.

PEREIRA, J. L.; MARQUES, C. R.; GONÇALVES, F.; Allometric relations for *Ceriodaphnia* spp and *Daphnia* spp. *Annales de Limnologie - International Journal of Limnology* n.40, v.1. p. 11-14. 2004.

PIVELI, R. P, KATO, M. T. Qualidade das águas e poluição: aspectos físico-químicos. **ABES**. 2006.

PORRA, R. J.; THOMPSON, W. A.; KRIEDEMANN, P. E. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. **Biochimica et Biophysica Acta**, n. 975, p.384-394, 1989.

RAI, L. C.; GAUR, J. P.; SOEDER C. J. Algae and Water Pollution, E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, **Advances in Limnology**, n. 42. Stuttgart, 1994.

RUIZ L.B., ROCHETTA T., DOS SANTOS FERREIRA V. CONFORTI V.T.D. Isolation, culture and characterization of a new strain of *Euglena gracilis*. **Phycological Research**. n. 52 p. 168-174. 2004.

RODRIGUEZ- ZAVALA J.S., GARCÍA-GARCÍA J.D., ORTIZ- CRUZ M.A., MORENO-SANCHEZ R. Molecular mechanisms of resistance to heavy metals in the protist *Euglena gracilis*. **Journal of Environmental Science Health, Part A**

**Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering.** n. 42(10). p. 1365-1378. 2007.

SANTA CATARINA. Plano Estadual de Prevenção e Tratamento de Doenças Renais e de Organização da Rede de Assistência de Alta Complexidade em Nefrologia em Santa Catarina. MAGAJEWSKI, Flávio – Diretor , 2005. Disponível em: <<http://portalses.saude.sc.gov.br/>>. Acesso em: 20 abr. 2012.

SANCHES, L. A. H. **Reuso de água em Hospitais: O caso do hospital Santa Casa de Misericórdia de Itajubá.** Itajubá, 2008. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Itajubá (UNIFEI).

SCHVARTSMAN, S. Intoxicações agudas. Sarvier. 4º Ed. p. 355. São Paulo. 1991.

SILVA, A. M. M.; MARTINS, C. T. B.; FERRABOLI, R.; JORGETTI, V.; Junior, J. E. R. Água para hemodiálise. **J. Brás. Nefrol.** 180-188, 1996.

Sociedade Brasileira de Nefrologia. Disponível em: <[www.sbn.org.br](http://www.sbn.org.br)>. Acesso em: 02 ago. 2012.

Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater, 20th edition. **3111 Metals By Flame Atomic Absorption Spectrometry.** United Book Press, Inc., 1998.

STARR, R. C. The culture collection of algae at Indiana University. **American Journal of Botany**, n.51, p.1013-1044, 1964.

STREB, C.; RICHTER, P.; NTEFIDOU, M.; LEBERT, M.; HÄDER, D. P. Sensory transduction of gravitaxis in *Euglena gracilis*. **J. Plant Physiol.** n.159, p.855-862, 2002.

TAHEDL, H.; HÄDER, D-P. Automated biomonitoring using real time movement analysis of *Euglena gracilis*. **Ecotoxicological and Environmental Safety.** v. 48, p.161-169, 2001.

TAHEDL, H.; HÄDER, D-P. Fast examination of water quality using the automatic biotest ECOTOX based on the movement behavior of a freshwater flagellate. **Water Research**, v. 33, p. 426-432. 1999.

TAHEDL, H.; RICHTER, P.; LEBERT, M.; HÄDER, D. P. CAMP is involved in gravitaxis signal transduction of *Euglena gracilis*. **Micrograv. Sci.Technol.** n. 11, p.173-178, 1998.

TUNDISI, J. G.; TUNDISI, T. M. **Limnologia**. SP: Oficina de Textos, p.631. 2008.

TARRASS, F.; BENJELLOUN, M.; BENJELLOUN, O. Recycling Wastewater After Hemodialysis: An Environmental Analysis for Alternative Water Sources in Arid Regions , **J Kidney**. n. 52. p.154-158. 2008.

TAYLOR, F. The Biology of Dinoflagellates. **Blackwell Scientific Publications, Oxford**, London, 1987.

THOMANN, R.; MUELLER V. B.; MUELLER, J. A. Principles of surface water quality modeling and control. New York: **Harper & Row**, 1987.

WEBER, C. I. **Method for measuring the acute toxicity of effluents and receiving water to freshwater and marine organisms**. Cincinnati, Ohio: EPA, p. 253, 1993.

WILLEMANN, R. L. **Development of an application of the ECOTOX system in the estuarine zone of the Baía da Babitonga, SC, Brazil**. Erlangen-Nürnberg, Germany, 2002. Master Thesis, Friedrich- Alexander University (FAU).

WOHLLEBE, S. *et al.colocar os outros autores*. Photodynamic control of human pathogenic parasites in aquatic ecosystems using chlorophyllin and pheophorbid as photodynamic substances. **Parasitol Research**, v. 104, n. 3, p. 593-600. 2009.

ZAGATTO, P. A. Ecotoxicologia. *In*: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. (Eds.) **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações**. 2. ed. São Carlos: RIMA, p.486. 2008.

ZEHR, J. P.; WARD, B. B. Nitrogen cycling in the ocean: new perspectives on processes and paradigms. **Environmental Microbiology**, n. 68, p. 1015-1024. 2002.