

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**Avaliação da toxicidade e genotoxicidade dos corantes azo reativos
Remazol Preto B e Remazol Alaranjado 3R e da eficácia da radiação
com feixe de elétrons na redução da cor e efeitos tóxicos**

ALESSANDRO DE SÁ PINHEIRO

Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do grau de
Doutor em Ciências na área de
Tecnologia Nuclear – Aplicações

Orientadora: Dra. Sueli Ivone Borrely

Co-orientadora: Dra. Eliana Nakano

SÃO PAULO

2011

Dedico este trabalho à minha família, amigos e, especialmente, a meus filhos Thiago e Rodrigo e esposa Suzi.

Agradecimentos

À toda minha família, especialmente minha esposa Suzi e meus filhos Thiago e Rodrigo, por terem me apoiado incondicionalmente e agüentado todo meu mau humor durante essa difícil etapa.

À Dra. Sueli Ivone Borrely por ter me acolhido cientificamente e proporcionado a execução desse trabalho. Por ter acreditado em mim e ter investido seu tempo, paciência, compreensão e conhecimento durante todo o doutorado.

À Dra. Eliana Nakano pelas valiosas discussões científicas, orientação e apoio durante os momentos difíceis.

À Dra. Toshie Kawano (*in memoriam*) por ter aberto as portas do laboratório de Parasitologia/ Malacologia do Instituto Butantan, onde chefiava. Sempre foi uma incentivadora e grande amiga.

À Dra. Denise Alves Fungaro pela colaboração, parceria e incentivo.

À Dra. Kayo Okazaki e a toda sua equipe por várias vezes ter fornecido seu laboratório e equipamentos para realização do teste do cometa.

Ao Dr. Afonso Rodrigues de Aquino pelos ensinamentos dentro e fora da sala de aula.

Aos amigos que fui conhecendo e admirando durante toda a caminhada na pós-graduação: Lenita, Miriam, Suzete, José Caldeira, Gabriel, Neto, Letícia, Natália, Marcela, Ana Toledo, Ludmila, Patrícia, Vanessa Grazeffe, Vanessa Garcia, Rebeca, Renata Leão, Dymes Rafael, Priscila, Cristina, Alex, Jurema, Lurdinha, Renato, Michel.

Ao grande amigo e técnico do laboratório Reginaldo.

Aos amigos e funcionários do CTR/IPEN, em especial, Djalma e Edimilson.

Aos amigos e funcionários do Laboratório de Parasitologia/Malacologia do Instituto Butantan.

Aos amigos Romero, Jefferson, Bruno e Vinícius do PECE/Poli.

Ao técnico Alexander do Instituto Butantan pelo auxílio no uso do confocal para a análise e captura dos cometas.

A toda equipe do acelerador de elétrons: Elisabeth Somessari, Samir Luiz Somessari e Carlos Gaia.

Ao secretário do CTR/IPEN Marcos e a CPG do IPEN.

Ao CTR/IPEN e ao Instituto Butantan pela infra-estrutura colocada a disposição.

À Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN) por ter proporcionado bolsa de estudo.

A todos os amigos e familiares que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão da pós-graduação.

A todos aqueles que acreditaram em mim e aos amigos que possa ter esquecido de citar.

Avaliação da toxicidade e genotoxicidade dos corantes azo reativos Remazol Preto B e Remazol Alaranjado 3AR e da eficácia da radiação com feixe de elétrons na redução da cor e efeitos tóxicos

Alessandro de Sá Pinheiro

RESUMO

As indústrias têxteis desempenham um importante papel na economia nacional e mundial. Entretanto, do ponto de vista ambiental, suas atividades são consideradas como potencialmente poluidoras e utilizadoras de recursos naturais. Os corantes azo reativos são os principais corantes utilizados no setor para o tingimento do algodão no Brasil e no mundo. Devido à sua baixa fixação à fibra e a variações no processo de produção, cerca de 30 % da concentração inicial utilizada nos banhos de tingimento são perdidos e vão compor o efluente final. Esses compostos apresentam uma baixa biodegradabilidade e elevada solubilidade em água e, por isso, não são completamente removidos pelos processos biológicos convencionais. Os corantes quando descartados sem tratamento adequado no corpo d'água receptor podem causar modificações estéticas, alterar a fotossíntese e a solubilidade dos gases, além de serem tóxicos e genotóxicos para a biota. Os principais objetivos do trabalho foram avaliar a toxicidade e genotoxicidade de dois diferentes corantes azo reativos (Remazol Preto B – RPB e Remazol Alaranjado 3R – R3AR) e a eficiência de redução da cor e toxicidade após o uso da radiação com feixe de elétrons. Também foi analisada a toxicidade dos corantes em diferentes formas químicas, que podem ser encontradas nos efluentes. Os ensaios de toxicidade aguda realizados com *Vibrio fischeri*, *Daphnia similis* e *Biomphalaria glabrata* evidenciaram diferentes padrões de resposta para os corantes. Os dois corantes em suas formas químicas foram levemente tóxicos para *Vibrio fischeri*, com exceção da forma vinilsulfona do corante RPB que foi tóxico ($CE(I)50_{15min} = 6,23 \text{ mg L}^{-1}$). Nos ensaios com *Daphnia similis*, o corante RPB foi levemente tóxico na sua forma original, sulfatoetilsulfona ($CE(I)50_{48h} = 91,25 \text{ mg L}^{-1}$) e não apresentou toxicidade nas demais formas químicas. Entretanto, o corante R3AR foi tóxico para o dafnídeo, sendo muito tóxico na forma vinilsulfona ($CE(I)50_{48h} = 0,54 \text{ mg L}^{-1}$). Não foi observada toxicidade nos ensaios com o organismo *Biomphalaria glabrata*. A toxicidade crônica foi avaliada com o organismo *Ceriodaphnia dubia* e o corante RPB apresentou valores de CENO e CEO iguais a 12,5 e 25 mg L^{-1} , respectivamente, para a forma sulfatoetilsulfona. Após a hidrólise do corante (vinilsulfona e hidroxietilsulfona) foi observado um aumento os valores obtidos de CENO e CEO. Não foi verificado efeito crônico para o corante R3AR e suas formas químicas. O teste do cometa adaptado para o caramujo *Biomphalaria glabrata* foi utilizado para avaliar a genotoxicidade dos corantes. O corante RPB apresentou genotoxicidade nas concentrações mais elevadas (1 e 2 g L^{-1}), com valores de dano quantitativo de 117 e 112 e o R3AR não foi genotóxico. O uso da radiação com feixes de elétrons demonstrou eficácia na remoção da cor dos corantes. Com a dose de 10 kGy foi possível uma redução de 97,64 % para RPB e de 96,8 % para R3AR. Após irradiação do corante RPB com a dose de 10 kGy foi evidenciada uma redução de 59,52 % da toxicidade aguda avaliada com *Vibrio fischeri*. Nas demais doses não houve redução significativa, assim como na avaliação com *Daphnia similis*, onde os valores de $CE(I)50_{48h}$ obtidos foram menores que o corante não irradiado. O corante R3AR apresentou diminuição da toxicidade mais acentuada após a radiação quando comparado com o RPB, com reduções de 82,95 % (*V. fischeri*) e 71,26 % (*D. similis*) com 10 kGy.

Assessment of toxicity and genotoxicity of the reactive azo dyes Remazol Black B and Remazol Orange 3R and effectiveness of electron beam irradiation in the reduction of color and toxic effects

Alessandro de Sá Pinheiro

ABSTRACT

The textile industries play an important role in national and global economy. But, their activities are considered potentially polluting. The use of large volumes of water and the production of colored wastewater with high organic matter are among the main issues raised, especially during the stage of dyeing and washing of the textile process. The reactive azo dyes are the main colors used in the industry for dyeing of cotton in Brazil and worldwide. Because of its low setting and variations in the fiber production process, about 30% of the initial concentration used in the dyeing baths are lost and will compose the final effluent. These compounds have a low biodegradability, are highly soluble in water and therefore are not completely removed by conventional biological processes. In addition, other processes do not promote degradation but the tranference to solid environment. The dyes discarded without treatment in the water body can cause aesthetic modifications, alter photosynthesis and gas solubility, as well as being toxic and genotoxic. The main objectives of this study were to evaluate the toxicity and genotoxicity of two reactive azo dyes (Remazol Black B - RPB and Remazol Orange 3R – R3AR) and the percentage of color and toxicity reduction after the use of electron beam radiation. The acute toxicity assays performed with *Vibrio fischeri*, *Daphnia similis* and *Biomphalaria glabrata* showed different response patterns for dyes. The different chemical forms of dyes were slightly toxic to *Vibrio fischeri* and only the RPB dye (vinylsulphone) was toxic ($EC_{50,15min} = 6,23 \text{ mg L}^{-1}$). In tests with *Daphnia similis*, the dye RPB was slightly toxic in its patern form, sulphatoethylsulphone, ($CE_{50,48h} = 91,25 \text{ mg L}^{-1}$) and showed no toxicity in other chemical forms. However, the RA3R dye was toxic to the dafnids and the vinylsulphone form very toxic ($EC_{50,48h} = 0,54 \text{ mg L}^{-1}$). No toxicity was observed in *Biomphalaria glabrata* assays. Chronic toxicity was assessed with the organism *Ceriodaphnia dubia* and the NOEC and OEC values of RPB dye (sulphatoethylsulphone) were 12.5 and 25 mg L^{-1} , respectively. After hydrolysis of the dye (vinylsulphone and hydroxyethylsulphone) was shown to increase the values obtained from the NOEC ans OEC. There was no chronic effect for the R3AR dye and its chemical forms to *C. dubia*. The comet assay adapted to hemocytes of *Biomphalaria glabrata* was used to assess the genotoxicity of the dyes. The RPB dye was genotoxic at highest concentrations (1 and 2 g L^{-1}), with quantitative values of DNA damage equal to 117 and 112 and the R3AR dye was not genotoxic. The use of radiation with electron beams have proven effective in removing the color dyes. With a dose of 10 kGy a reduction of 97.64% and 96.8% for R3AR and RPB, respectively, was achieved. Possibly, the color removal was mainly due to the interaction of reactive species such as hydroxyl radicals generated in the radiolysis of water after the radiation beam of electrons. After radiation of the RPB dye a dose of 10 kGy reduced 59.52 % of the acute toxicity measured with *Vibrio fischeri*. For the other doses there was no significant reduction, as well as with *Daphnia similis*, where the values of $EC_{50,48h}$ obtained were smaller than the non-irradiated dye. The R3AR dye showed better decreased toxicity after radiation when compared with the RPB, with reductions of 82.95% (*V. fischeri*) and 71.26% (*D. similis*) with 10 kGy.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Justificativa.....	3
2. OBJETIVOS.....	5
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E CONSIDERAÇÕES TEÓRICAS.....	6
3.1. Características Gerais dos Corantes Reativos	7
3.2. Efluentes Têxteis e Principais Tipos de Tratamento.....	10
3.2.1. <i>Processos Oxidativos Avançados</i>	14
3.3. Radiação de Feixe de Elétrons.....	17
3.3.1. <i>Interação da Radiação com a Matéria</i>	20
3.3.2. <i>Radiólise da Água</i>	20
3.3.3. <i>Custo do Tratamento com Feixe de Elétrons</i>	24
3.3.4. <i>Degradação de Corantes e Efluentes Têxteis Utilizando Radiação de Feixe de Elétrons</i>	25
3.4. Legislação Relacionada ao Lançamento de Efluentes.....	26
3.5. Aspectos Ambientais dos Corantes Têxteis.....	28
3.6. Aspectos Ecotoxicológicos dos Corantes Têxteis.....	29
3.7. Aspectos Genotóxicos dos Corantes Têxteis.....	30
3.8. Características dos Corantes Remazol Preto B 133% e Remazol Alaranjado 3R 133%	33
3.9. Organismos <i>Vibrio fischeri</i> , <i>Daphnia similis</i> , <i>Ceriodaphnia dubia</i> e <i>Biomphalaria glabrata</i>	35
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
4.1. Preparo dos Corantes – Sulfatoetilsulfona.....	39
4.2. Preparo dos Corantes – Vinilsulfona.....	39
4.3. Preparo dos Corantes – Hidroxietilsulfona.....	39
4.4. Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	40
4.5. Ensaio de Toxicidade Aguda com <i>Vibrio fischeri</i>	41
4.5.1. <i>Determinação da Concentração Efetiva Mediana CE(I)₅₀</i>	41
4.6. Ensaio de Toxicidade Aguda com <i>Daphnia similis</i>	42
4.6.2. <i>Determinação da Concentração Efetiva Mediana CE(I)₅₀</i>	43

4.7. Ensaio de Toxicidade Aguda com <i>Biomphalaria glabrata</i>	44
4.7.1. Determinação da Concentração Letal Mediana CL_{50} em Adultos.....	44
4.8. Ensaio de Toxicidade Crônica com <i>Ceriodaphnia dubia</i>	45
4.8.1. Determinação da Concentração de Efeito Observado, Concentração de Efeito Não Observado e Valor Crônico (CEO, CENO e Vc).....	46
4.9. Ensaio de Genotoxicidade - Teste do Cometa adaptado a <i>Biomphalaria glabrata</i>	47
4.9.1. Exposição <i>In vivo</i>	47
4.9.2. Metodologia do Teste do Cometa.....	47
4.10. Irradiação dos Corantes com Feixes de Elétrons.....	50
4.11. pH e condutividade.....	52
4.12. Carbono Orgânico Total	52
4.13. Toxicidade Aguda dos Corantes Irrradiados.....	52
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
5.1. Cromatografia de Camada Delgada.....	53
5.2. Ensaio de Toxicidade Aguda.....	54
5.2.1. Ensaio em relação à Sensibilidade	54
5.2.2. Avaliação da Toxicidade Aguda em <i>Vibrio fischeri</i>	56
5.2.3. Avaliação da Toxicidade Aguda em <i>Daphnia similis</i>	58
5.2.4. Avaliação da Toxicidade Aguda em <i>Biomphalaria glabrata</i>	59
5.3. Avaliação da Toxicidade Crônica em <i>Ceriodaphnia dubia</i>	60
5.4. Avaliação da Genotoxicidade dos Corantes.....	67
5.5. Irradiação com Feixe de Elétrons.....	71
5.5.1. Avaliação do pH e Condutividade.....	74
5.5.2. Carbono Orgânico Total (COT).....	76
5.5.3. Avaliação da Toxicidade Aguda dos Corantes Irrradiados com Feixe de Elétrons...	76
6. CONCLUSÕES.....	80
9. SUGESTÕES PARA TRABALHO FUTURO.....	81
10. ANEXO.....	82
11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	110

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Etapas de beneficiamento do algodão na indústria têxtil.....	11
FIGURA 2. Comparação entre o acelerador de elétrons e o tubo de televisão.....	19
FIGURA 3. Estrutura química do corante Remazol Preto B 133% na forma sulfatoetilsulfona.....	34
FIGURA 4. Estrutura química do corante Remazol Alaranjado 3R 133% na forma sulfatoetilsulfona.....	34
FIGURA 5. Reação entre o para-base-ester e o ácido gama acetilado para a formação do corante têxtil Remazol Alaranjado 3R 133%.....	35
FIGURA 6. Reação entre o (a) para-base-ester e o (b) ácido H para a formação do (c) corante têxtil Remazol Preto B 133%	35
FIGURA 7. Fluxograma da metodologia.....	38
FIGURA 8. Modificação estrutural do corante Remazol Preto B 133% (vinilsulfona e hidroxietilsulfona).....	40
FIGURA 9. Bactéria marinha <i>Vibrio fischeri</i>	41
FIGURA 10. Microcrustáceo <i>Daphnia similis</i>	42
FIGURA 11. Espécime adulto de <i>Biomphalaria glabrata</i>	44
FIGURA 12. Microcrustáceo <i>Ceriodaphnia dubia</i>	45
FIGURA 13. Classes de danos detectado em hemócito de <i>B.glabrata</i> – análise visual.....	49
FIGURA 14. Cromatografia do corante Remazol Preto B 133% (2 g/L); (1) hidroxietilsulfona; (2) sulfatoetilsulfona; (3) vinilsulfona; e Remazol Alaranjado 3R 133% (4) hidroxietilsulfona; (5) sulfatoetilsulfona; (6) vinilsulfona.....	53
FIGURA 15. Sensibilidade do organismo <i>V. fischeri</i> ao fenol.....	55
FIGURA 16. Sensibilidade do organismo <i>D.similis</i> ao dicromato de potássio.....	55
FIGURA 17. Toxicidade aguda Toxicidade aguda dos corantes Remazol Preto B 133% e Remazol Alaranjado 3R 133% em diferentes formas químicas ao organismo <i>Vibrio fischeri</i> ..	57

FIGURA 18. Sensibilidade do organismo <i>C. dubia</i> ao cloreto de potássio.....	61
FIGURA 19. Reprodução de <i>C. dubia</i> exposta ao corante Remazol Preto B 133% na forma sulfatoetilsulfona.....	63
FIGURA 20. Reprodução de <i>C. dubia</i> exposta ao corante Remazol Preto B 133% na forma vinilsulfona.....	63
FIGURA 21. Reprodução de <i>C. dubia</i> exposta ao corante Remazol Preto B 133% na forma hidroxietilsulfona.....	64
FIGURA 22. Reprodução de <i>C. dubia</i> exposta ao corante Remazol Alaranjado 3R 133% na forma sulfatoetilsulfona.....	65
FIGURA 23. Reprodução de <i>C. dubia</i> exposta ao corante Remazol Alaranjado 3R 133% na forma vinilsulfona.....	65
FIGURA 24. Reprodução de <i>C. dubia</i> exposta ao corante Remazol Alaranjado 3R 133% na forma hidroxietilsulfona.....	66
FIGURA 25. Expressão do Dano Quantitativo no DNA após a exposição às concentrações de 1, 10 e 50 mg L ⁻¹ de etilmetanosulfonato.....	68
FIGURA 26. Expressão do Dano Quantitativo no DNA após a exposição às concentrações de 100, 500, 1000 e 2000 mg L ⁻¹ ao corante Remazol Preto B 133% (sulfatoetilsulfona).....	69
FIGURA 27. Expressão do Dano Quantitativo no DNA após a exposição às concentrações de 100, 500, 1000 e 2000 mg L ⁻¹ ao corante Remazol Alaranjado 3R 133% (sulfatoetilsulfona).....	70
FIGURA 28. Espectro UV/visível do corante Remazol Alaranjado 3R 133% - sulfatoetilsulfona (200 mg L ⁻¹)- após irradiação com feixes de elétrons.....	72
FIGURA 29 . Espectro UV/visível do corante Remazol Preto B 133% - sulfatoetilsulfona (200 mg L ⁻¹)- após irradiação com feixes de elétrons.....	72
FIGURA 30. Porcentagem de descoloração dos corantes Remazol Preto B 133% e Remazol Alaranjado 3R 133% após a irradiação com diferentes doses de feixe de elétrons.....	74
FIGURA 31. Variação do pH dos corantes Remazol Preto B 133% e Remazol Alaranjado 3R 133% - sulfatoetilsulfona (200 mg L ⁻¹) – após irradiação com feixe de elétrons.....	75
FIGURA 32. Variação da condutividade dos corantes Remazol Preto B 133% e Remazol Alaranjado 3R 133% - sulfatoetilsulfona (200 mg L ⁻¹) – após irradiação com feixe de elétrons.....	75

FIGURA 33. Concentração de COT presentes nas amostras do corante Remazo Preto B.....	76
FIGURA 34. Toxicidade aguda para <i>V.fischeri</i> e <i>D.similis</i> do corante Remazol Preto B 133% após irradiação com feixes de elétrons.....	78
FIGURA 35. Toxicidade aguda para <i>V.fischeri</i> e <i>D.similis</i> do corante Remazol Alaranjado 3R 133% após irradiação com feixes de elétrons.....	79

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Classificação dos corantes têxteis, tipo de ligação com a fibra e faixa de exaustão.....	7
TABELA 2. Participação no mercado mundial de diferentes classes de corantes.....	8
TABELA 3. Características do efluente gerado no beneficiamento do algodão.....	12
TABELA 4. Principais Processos Oxidativos Avançados.....	15
TABELA 5. Características gerais dos corantes utilizados no trabalho.....	34
TABELA 6. Condições de irradiação utilizadas no acelerador de elétrons para a irradiação dos corantes.....	50
TABELA 7. Valores de dose e taxa de dose correspondente a intensidade de corrente aplicada no acelerador de elétrons.....	51
TABELA 8. Toxicidade aguda dos corantes Remazol Preto B 133% e Remazol Alaranjado 3R 133% em diferentes formas químicas ao organismo <i>Vibrio fischeri</i>	56
TABELA 9. Toxicidade aguda dos corantes Remazol Preto B 133% e Remazol Alaranjado 3R 133% em diferentes formas químicas ao organismo <i>Daphnia similis</i>	58
TABELA 10. Toxicidade aguda dos corantes Remazol Preto B 133% e Remazol Alaranjado 3R 133% em diferentes formas químicas ao organismo <i>Biomphalaria glabrata</i>	59
TABELA 11 - Toxicidade aguda do corante Remazol Preto B 133% nas diferentes formas químicas para <i>V.fischeri</i> , <i>D.similis</i> e <i>B.glabrata</i>	60
TABELA 12- Toxicidade aguda do corante Remazol Alaranjado 3R 133% nas diferentes formas químicas para <i>V.fischeri</i> , <i>D.similis</i> e <i>B.glabrata</i>	60

TABELA 13. Toxicidade crônica do corante Remazol Preto B 133% nas diferentes formas químicas.....	62
TABELA 14. Toxicidade crônica do corante Remazol Alaranjado 3R 133% nas diferentes formas químicas.....	64
TABELA 15. Teste do cometa em hemócitos de caramujos adultos <i>Biomphalaria glabrata</i> expostos ao etilmetanosulfonado.....	67
TABELA 16. Teste do cometa em caramujos adultos <i>Biomphalaria glabrata</i> expostos ao corante Remazol Preto B 133% - sulfatoetilsulfona (DD – dano quantitativo; n=6).....	69
TABELA 17. Teste do cometa em caramujos adultos <i>Biomphalaria glabrata</i> expostos ao corante Remazol Alaranjado 3R 133% - sulfatoetilsulfona - (DD – dano quantitativo; n=6).....	70
TABELA 18. Toxicidade aguda para <i>V.fischeri</i> e <i>D.similis</i> do corante Remazol Preto B 133% após irradiação com feixes de elétrons.....	77
TABELA 19. Toxicidade aguda para <i>V.fischeri</i> e <i>D.similis</i> do corante Remazol Alaranjado 3R 133% após irradiação com feixes de elétrons.....	79

**“A mente que se abre a uma nova idéia,
jamais voltará a seu tamanho original.”**

Albert Einstein

1. INTRODUÇÃO

O Homem sempre recorreu ao meio ambiente para suprir suas necessidades básicas de sobrevivência. Durante milhares de anos, os impactos causados ao meio ambiente pelas atividades humanas eram pequenos e havia tempo suficiente para recuperação natural. A partir da Revolução Neolítica as sociedades humanas desenvolveram técnicas de cultivo agrícola. O Homem passou de parasita a sócio ativo da natureza, se fixando definitivamente em um local e adaptando-o às suas necessidades, tendo por base uma economia produtora.

O impacto das atividades humanas sobre o meio ambiente aumentou significativamente a partir do início da Revolução Industrial, que iniciou na Inglaterra em 1760 e gradativamente se tornou um fenômeno mundial. Os fatores primordiais para o início da industrialização mundial foram o desenvolvimento científico e tecnológico; o crescimento populacional, criando um forte mercado consumidor de bens manufaturados e a migração do homem do campo para as grandes cidades, gerando um excesso de mão de obra barata (Moura, 2006).

Com a industrialização, os países passaram a obter um rápido crescimento econômico, baseado no uso dos recursos naturais para o aumento da produção e consumo, concretizando profundas mudanças socioeconômicas. A renda *per capita* e a população começam a crescer de forma acelerada com constante migração do homem para as cidades, ocorre a mecanização da agricultura, modificação dos meios de transporte de pessoas e de carga, nos meios de comunicação, dentre outros. O modelo capitalista é fortalecido com grandes conseqüências sociais para as cidades urbanas, geradas, principalmente, pela concentração de riqueza e o desemprego (Moura, 2006).

Dentro dessa perspectiva, a questão ambiental teve seu início no final dos anos 50 do século XX. Nas nações mais industrializadas, a sociedade em geral passou a constatar uma deterioração na qualidade de vida, afetando a saúde tanto física quanto psicológica dos habitantes das grandes cidades. Eventos como os ocorridos em Donora, 1958, Londres, 1952, Minamata, 1941-1971 e outros, onde milhares de pessoas morreram devido a exposição à poluição foram o despertar dos cidadãos para a deterioração da qualidade do ar e da água (Dias, 1992).

A percepção e conscientização das questões ambientais ganharam força na década de 70 com o surgimento dos primeiros movimentos ambientalistas. Além disso, outro marco histórico foi a

realização da primeira conferência internacional para discussão dos temas ambientais, a Conferência de Estocolmo, realizada em 1972 com a participação de 113 países (Loureiro, 2004).

Outras conferências mundiais foram acontecendo e, com isso, aumentando as exigências da sociedade, refletindo em uma legislação ambiental mais rigorosa e uma conseqüente internalização das questões socioambientais pelas empresas.

Todos os processos industriais produzem resíduos, sejam eles sólidos, líquidos ou gasosos, em maior ou menor quantidade. Antes de serem descartados é imprescindível que ocorra um tratamento adequado, sempre obedecendo aos padrões ambientais estabelecidos pela legislação.

Com o passar do tempo, percebeu-se que a geração de resíduos industriais é resultado da ineficiência de transformação de insumos (matéria-prima, água e energia) em produtos, acarretando em danos ao meio ambiente e custos para as empresas. A solução para minimizar o problema veio com a adoção de técnicas de controle preventivo, evitando ou diminuindo a geração de resíduos na fonte. Ainda assim, muitas empresas ainda relutam em adotar tais medidas.

Entretanto, alguns setores apresentam dificuldades para redução e tratamento dos resíduos gerados durante o processo industrial. O setor têxtil se enquadra como atividade potencialmente poluidora pela resolução do CONAMA 237/97. A indústria têxtil é caracterizada pela utilização de grandes volumes de água durante todo o processo produtivo, além de utilizar diversos tipos de corantes que apresentam baixa fixação à fibra e são resistentes ou apresentam uma cinética de degradação lenta para os processos biológicos convencionais. Com isso, um dos maiores problemas ambientais encontrados por essas empresas é a descoloração de seus efluentes, caracterizados por também apresentarem uma elevada carga orgânica e toxicidade (Ong *et al.*, 2005).

O principal impacto causado pelos efluentes têxteis é a deteriorização do corpo d'água receptor, com a introdução de compostos antrópicos que podem desequilibrar o ecossistema local e inviabilizar seu uso para atividades mais nobres, tais como, o abastecimento público.

Diante dos riscos ambientais causados, principalmente, pela presença dos corantes, novas tecnologias têm sido desenvolvidas para sua degradação ou imobilização nos efluentes. Os processos oxidativos avançados (POA) representam a mais recente e potente técnica de

tratamento para efluentes contendo corantes. Os POAs são baseados na produção *in situ* de espécies oxidantes como as hidroxilas (OH^\bullet), que provocam uma seqüência de reações capazes de quebrar as moléculas e em muitos casos mineralizá-las (Rauf e Ashraf, 2009).

No Brasil, bem como outros países, campos de pesquisa estudam a utilização da radiação de efluentes com aceleradores de elétrons, com importantes resultados sobre a eficiência da irradiação na redução da toxicidade de efluentes considerados críticos (Borrely *et al.*, 2001). O uso da radiação com feixes de elétrons na degradação de poluentes orgânicos recalcitrantes é baseado na geração dos produtos reativos da radiólise da água, com destaque para os radicais hidroxila (OH) e elétron aquoso (e_{aq}) (Duarte *et al.*, 2000; Wojnárovits *et al.*, 2008).

1.1. Justificativa

A indústria têxtil é caracterizada por ser uma atividade potencialmente poluidora, principalmente, devido ao uso e a degradação de recurso natural. Em todo o processo industrial têxtil são utilizados elevados volumes de água que ao final vão gerar grandes volumes de efluentes com elevada coloração, carga orgânica e toxicidade, principalmente, devido à presença de corantes dissolvidos e dispersos, amaciantes, fixadores e tensoativos.

A dificuldade da remoção da cor, a geração de grande quantidade de lodos nas ETEs das indústrias têxteis, que também traduz um impacto ambiental significativo, e o potencial tóxico e mutagênico dos corantes, principalmente dos azo corantes que podem liberar aminas aromáticas após clivagem da ligação azo e também formar compostos incolores como 2-fenilbenzotriazóis (PBTAs), são questões importantes que impulsionam diversas pesquisas e o desenvolvimento de novas tecnologias para minimizar os impactos causados pelo setor têxtil.

Dentro desse contexto, neste trabalho foi avaliada a toxicidade aguda dos corantes azo reativos Remazol Preto B 133% (RPB) e Remazol Alaranjado 3R 133% (RA3R), nas diferentes formas químicas que podem ser encontradas nos efluentes finais - sulfatoetilsulfona, vinilsulfona e hidroxietilsulfona - para três organismos aquáticos, *Vibrio fischeri*, *Daphnia similis* e *Biomphalaria glabrata*. *Ceriodaphnia dubia* foi o organismo utilizado para determinar a toxicidade crônica dos corantes. O potencial genotóxico dos corantes na forma comercial sulfatoetilsulfona foi determinado utilizando-se o teste do cometa adaptado ao organismo

Biomphalaria glabrata. Além disso, a irradiação com feixe de elétrons foi proposta como alternativa para o tratamento desses corantes, visando à redução de cor e toxicidade.

2. OBJETIVO

O objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos tóxicos e genotóxicos dos corantes azo reativos Remazol Preto B 133% (C.I. Reactive Black 5) e Remazol Alaranjado 3R 133% (C.I. Reactive Orange 16) e o potencial da radiação com feixe de elétrons na redução de sua coloração e de sua toxicidade.

Para atingir esse objetivo as seguintes etapas foram desenvolvidas:

- Determinação da toxicidade aguda e crônica dos corantes nas diferentes formas químicas, tais como a sulfatoetilsulfona, a vinilsulfona e a hidroxietilsulfona, utilizando os organismos *Vibrio fischeri*, *Daphnia similis*, *Biomphalaria glabrata* e *Ceriodaphnia dubia*;
- Avaliação da genotoxicidade dos corantes na forma comercial, sulfatoetilsulfona, utilizando-se o teste do cometa em *Biomphalaria glabrata*;
- Tratamento dos corantes na forma comercial, sulfatoetilsulfona, com feixe de elétrons, observando-se as modificações no espectro UV/Vis e nos valores de pH e condutividade;
- Determinação da toxicidade aguda dos corantes na forma comercial, sulfatoetilsulfona, após o tratamento com radiação de feixe elétrons, utilizando-se os organismos *Vibrio fischeri* e *Daphnia similis*.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E CONSIDERAÇÕES TEÓRICAS

O mercado mundial de corantes e pigmentos orgânicos, em produtos sem aditivos, é estimado na ordem de 0,9 milhões de toneladas. Pouco mais da metade da produção é concentrada nos corantes têxteis. Em termos de valores, são gerados cerca de 12 a 13 bilhões de dólares distribuídos entre os corantes e pigmentos orgânicos e inorgânicos (Zollinger, 2003).

O Colour Index (catálogo da Society of Dyes and Colourists) atribui a cada corante comercial um C.I. (“Colour Index name”) do nome genérico, que inclui a classe de aplicação e cor, e um número que indica a descoberta cronológica (<http://www.colour-index.org>). Mais de 8 mil corantes orgânicos sintéticos registrados estão associados ao setor têxtil. Para atender um mercado cada vez mais exigente, a indústria de corantes tem desenvolvido corantes econômicos, com propriedades específicas para obter boa fixação nos tecidos e alta resistência aos agentes desencadeadores do desbotamento (Kunz *et al.*, 2002).

Os corantes têxteis são compostos orgânicos com estruturas moleculares complexas, formadas por um ou mais grupos cromóforos (azo, antroquinona, nitro, etc), responsáveis pela cor do composto através da absorção de uma parte da energia radiante e grupos auxiliares que propiciam sua afinidade pela fibra têxtil (Duran *et al.*, 2000).

Dentre vários grupos cromóforos utilizados atualmente na síntese de corantes o mais representativo e largamente empregado pertence à família dos azo corantes, que se caracterizam por apresentar um ou mais grupamentos $-N=N-$ ligados a sistemas aromáticos. Os azo corantes representam cerca de 60% dos corantes utilizados no mundo, sendo extensivamente utilizados no tingimento de fibras têxteis (Kunz *et al.*, 2002).

Embora os grupos cromóforos forneçam cores às substâncias, a intensidade ou brilho da cor depende de um ou mais grupos químicos, denominados auxocromos. Grupos auxocromos são grupamentos saturados que quando ligados a um cromóforo modifica o comprimento de onda para a intensidade máxima de absorção, promovendo a intensidade da cor (Hao *et al.*, 2000).

Segundo Guaratini e Zanoni (2000) os diversos corantes utilizados podem ser classificados de acordo com sua estrutura química (antraquinona, azo, etc) ou de acordo com o método pelo qual ele é fixado à fibra têxtil. Os grupos auxiliares controlam a fixação da molécula cromofórica

ao substrato e constituem a base para que ocorra a divisão em categorias. A TABELA 1 resume as diferentes classes de corantes têxteis e suas principais características.

TABELA 1. Classificação dos corantes têxteis, tipo de ligação com a fibra e faixa de exaustão

Classe de corante	Característica	Tipo de ligação e fibra de aplicação	Grau de fixação (%)
Reativo	Aniônico, alta solubilidade	Ligação covalente, algodão, viscose, lã	60-90
Direto	Aniônico, alta solubilidade	Ligação iônica, algodão e viscose	70-95
Azóico	Coloidal após reação com a fibra, insolúvel	Precipitação <i>in situ</i> do corante na fibra, algodão e viscose	95-97
Ácido	Aniônico, alta solubilidade	Ligação iônica, nylon e lã	80-93
Vat ou à Cuba	Coloidal após reação com a fibra, insolúvel	Precipitação <i>in situ</i> do corante na fibra, algodão e viscose	80-95
Enxofre	Coloidal após reação com a fibra, insolúvel	Precipitação <i>in situ</i> do corante na fibra, algodão e viscose	60-90
Disperso	Dispersão coloidal, baixa solubilidade	Impregnação coloidal e adsorção, poliéster, nylon, fibras acrílicas, acetato de celulose	80-92
Pré-metalizados	Aniônico, baixa solubilidade	Ligação iônica, nylon e lã	90-98

Fonte: USEPA, 1997

3.1. Características Gerais dos Corantes Reativos

Os corantes reativos constituem uma classe de corantes que vêm sendo utilizada em larga escala pelas indústrias têxteis no mundo, em virtude da sua reatividade com as fibras e estabilidade da cor (TABELA 2). É a principal classe de corante utilizada no tingimento de

algodão. No Brasil os corantes reativos respondem por 57 % do mercado nacional, seguido pelos corantes dispersos com 37 % (ABIQUIM, 2006).

TABELA 2. Participação no mercado mundial de diferentes classes de corantes

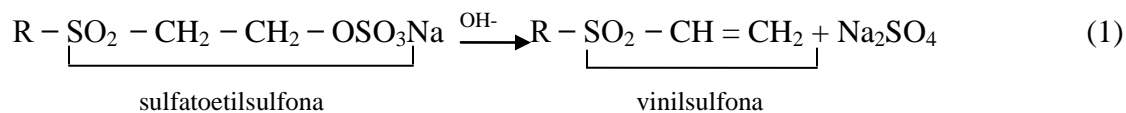
Classe de corante	Participação no mercado (%)
Disperso	16,2
Reativo	23,6
Ácido	18,6
Direto	7,7
Catiônico (Básico)	7,1
Outros*	26,8

* Inclui corantes do tipo vat, mordante, sulfuroso e azóico, bem como, índigo

Fonte: Zollinger, 2003

Dentre os diferentes tipos de corantes reativos, os principais contêm a função azo e antraquinona como grupos cromóforos e os grupos clorotriazinila e sulfatoetilsulfonila como grupos reativos. Estes se caracterizam por conter um, dois ou mais grupos reativos capazes de formar ligações covalentes com os grupos hidroxilas das fibras celulósicas, com os grupos amino, hidroxila e tióis de fibras protéicas e também com os grupos amino das poliamidas. Esses corantes apresentam alta solubilidade em água devido à presença de grupos sulfônicos e conferem maior estabilidade na cor do tecido tingido, quando comparado a outros corantes em que o processo de coloração se opera através de ligações de menor intensidade (Guaratini *et al.*, 2000).

A maioria dos corantes reativos é comercializada na forma sulfatoetilsulfona ($-\text{SO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OSO}_3\text{Na}$). Para que ocorra a ligação do corante com a fibra, a forma reativa do corante (vinilsulfona $-\text{SO}_2\text{CHCH}_2$) é gerada durante a etapa de tingimento pelo aumento do pH e temperatura. Sob essas condições, o grupamento vinilsulfona reage formando uma ligação covalente com os grupos amino ou hidroxila das fibras, levando à fixação do corante. Essa reação é representada pelas equações 1 e 2, (Wang *et al.*, 2003).



O tingimento é um processo químico que pode ser contínuo ou descontínuo (esgotamento). No processo contínuo o banho de impregnação permanece estacionado enquanto o substrato passa continuamente por ele, é espremido mecanicamente e fixado por calor seco, vapor ou repouso prolongado. No processo descontínuo por esgotamento, o corante é deslocado do banho para a fibra (Braile e Cavalcanti, 1993).

A etapa de tingimento com os corantes reativos caracteriza-se por apresentar concentrações dos corantes que variam de 10 a 70 g L⁻¹, presença de sais de 25 a 100 g L⁻¹ (NaCl ou Na₂SO₄), de 2 a 50 g L⁻¹ de Na₂CO₃ (ou a combinação de Na₂CO₃ e NaOH) e temperatura de 30 a 85 °C (Epolito *et al.*, 2005).

O grau de fixação do corante ao tecido é de 50 a 90%; o restante é rejeito e vai compor o efluente final. Essa perda é decorrente da possível reação do corante com a água, que hidrolisa o grupo vinilsulfona e gera a forma hidroxietilsulfona (- SO₂CH₂CH₂OH) durante o tingimento, sendo incapaz de se ligar à fibra. Além disso, esses corantes caracterizam-se por apresentarem baixa substantividade (propriedade do corante em se deslocar do banho de tingimento para a fibra) (Pearce *et al.*, 2003).

Portanto, no efluente final podem ocorrer concentrações do corante que variam de 5 a 1500 mg L⁻¹ (Gottlieb *et al.*, 2003) em diferentes formas químicas, além de altas concentrações de sal e elevados valores de pH (11-13), podendo atingir o corpo d'água receptor quando não tratados efetivamente (Epolito *et al.*, 2005).

Em virtude de sua natureza química, de seu tamanho e de sua estrutura molecular, os corantes azo reativos apresentam baixa biodegradabilidade aos processos biológicos convencionais (lodos ativados). Os corantes azo reativos são deficientes em elétrons e essa propriedade faz com que sejam pouco susceptíveis ao catabolismo oxidativo bacteriano. Além disso, sua natureza hidrofílica faz com que passem através do sistema aeróbio sem alteração. Entretanto, sob condições anaeróbias, a descolorização do corante pode ser realizada pela

redução do grupamento azo (N=N), gerando compostos que podem ser mais tóxicos e mutagênicos que o corante original (Ong *et al.*, 2005).

3.2. Efluentes Têxteis e Principais Tipos de Tratamento

A produção têxtil consiste em um conjunto de processos que transforma a matéria-prima (fibras naturais e manufaturadas ou químicas) em produtos têxteis, como os fios, os tecidos, etc. Estes processos são divididos, basicamente, em fiação, beneficiamento de fios, tecelagem, malharia, enobrecimento (beneficiamento de tecidos) e confecção, podendo ser uma indústria verticalizada, com todos os processos, ou ainda ter somente uma ou algumas fases da produção (Braile e Cavalcanti, 1993). Na FIGURA 1 é apresentado um resumo das principais etapas do beneficiamento do algodão.

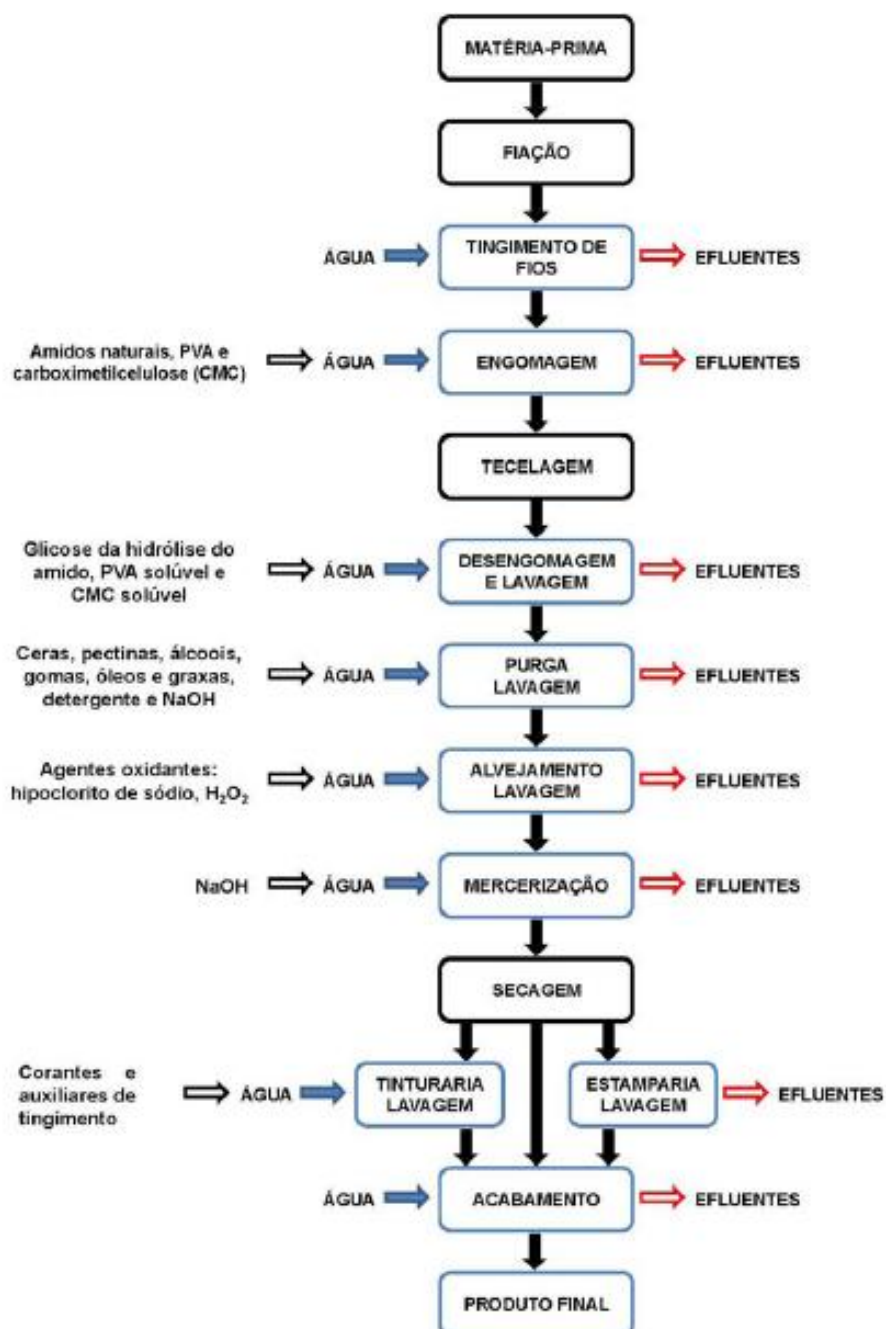


FIGURA 1. Etapas de beneficiamento do algodão na indústria têxtil

Fonte: Gomes, 2009

O setor têxtil é caracterizado pela utilização de grandes volumes de água no processo produtivo, principalmente nas etapas de lavagem, tingimento e acabamento, gerando altas vazões de despejos líquidos (Georgiou *et al.*, 2002).

Os efluentes de uma indústria têxtil são caracterizados por induzir variações nos diferentes parâmetros, como a demanda química de oxigênio (DQO), a demanda bioquímica de oxigênio (DBO), o pH, a cor e a salinidade, dependendo do tipo de processo e dos substratos têxteis usados. A composição do efluente está diretamente relacionada aos compostos químicos utilizados no processo de produção (Dos Santos, *et al.* 2007). Na TABELA 3 são representadas as principais características do efluente gerado no beneficiamento do algodão.

De um modo geral, os efluentes da manufatura têxtil apresentam-se fortemente coloridos, com grandes quantidades de sólidos suspensos, valores flutuantes de pH, elevada concentração de DQO e baixa biodegradabilidade, contendo vários tipos de corantes, surfactantes, metais, agentes engomantes, ácidos orgânicos e inorgânicos, além de outros compostos químicos orgânicos (Kim *et al.*, 2006; Almeida *et al.*, 2004).

TABELA 3. Características do efluente gerado no beneficiamento do algodão

Processo	DQO (g L ⁻¹)	DBO (g L ⁻¹)	Sólidos Totais (g L ⁻¹)	Sólidos Dissolvidos Totais (g L ⁻¹)	pH	Cor (ADMI)	Uso de Água (L kg ⁻¹)
Desengomagem	4,6-5,9	1,7-5,2	16-32	--	--	--	3-9
Lavagem	8	0,1-2,9	7,6-17,4	--	10-13	694	26-43
Branqueamento	6,7-13,5	0,1-1,7	2,3-14,4	4,8-19,5	8,5-9,6	153	3-124
Mercerização	1,6	0,05-0,1	0,6-1,9	4,3-4,6	5,5-9,5	--	232-308
Tingimento	1,1-4,6	0,01-1,8	0,5-14,1	0,05*	5-10	1450-4750	8-300

DQO, demanda química de oxigênio; DBO, demanda biológica de oxigênio; ADMI, American Dye Manufacturer Institute.

*No caso de alguns corantes reativos a concentração de sal na etapa de tingimento pode atingir 60-100 g L⁻¹. Além disso, os valores listados na tabela podem variar dependendo do tipo de fibra e classe de corante.

Fonte: Dos Santos, 2007

Segundo Freire *et al.*, 2000, devido à extrema complexidade dos efluentes industriais os processos de tratamento devem ser direcionados a um tipo particular de efluente, permitindo não somente a remoção de substâncias contaminantes como também sua completa mineralização. Os

diversos processos utilizados para o tratamento de efluentes industriais são classificados em físicos, químicos e biológicos, cada um com suas vantagens e desvantagens.

A opção por uma determinada técnica de tratamento ou por uma combinação entre duas ou mais técnicas é o que define um sistema de tratamento e deve fundamentar-se no conhecimento do potencial de cada processo e dos mecanismos envolvidos na redução do contaminante de interesse.

Um dos maiores problemas relacionados ao tratamento do efluente têxtil é a presença dos corantes oriundos, principalmente, das etapas de tingimento. A difícil degradação dos corantes, especialmente os azo corantes, é devido à sua estrutura complexa e natureza sintética (Tantak *et al*, 2006).

De uma forma geral, os corantes são recalcitrantes ou apresentam uma cinética de degradação lenta para os processos biológicos convencionais (lodos ativados) e geram efluentes finais com uma coloração ainda intensa, mesmo após o tratamento (Paschoal *et al.*, 2005).

Técnicas como a adsorção (Cicek *et al*, 2007), adsorção em carvão ativado (Órfão *et al*, 2006), coagulação/floculação (Lee *et al*, 2006; Papic *et al*, 2004), ultrafiltração (Zaghbani *et al*, 2007) e osmose reversa (Šostar-Turk *et al*, 2005) têm sido relatadas para a remoção de corantes têxteis. No entanto, além de serem mais dispendiosas do que os processos biológicos apenas realizam a transferência de fase sem a degradação do poluente e necessitam de pós-tratamento dos resíduos sólidos gerados ou regeneração do material adsorvente (Amorim *et al*, 2009).

Por outro lado, tratamento químico com oxidantes fortes (Cl_2 ou O_3) leva a resultados melhores, porém o custo do sistema pode ser elevado no caso de grandes vazões pelo uso de dose elevada e ao consumo de energia elétrica. Além disso, podem gerar compostos mais tóxicos. A cloração pode produzir organoclorados com elevada toxicidade e cloraminas que são tóxicas e mutagênicas (Robinson *et al*, 2001).

Outras formas de eliminação dos corantes baseiam-se na utilização de processos integrados que envolvem combinações entre processos biológicos, físicos e químicos (Robinson *et al*, 2001).

De acordo com Kunz *et al.*, 2002, em geral, os processos de tratamento de efluentes na indústria têxtil estão fundamentados na operação de sistemas físico-químicos de precipitação-coagulação, seguidos de tratamento biológico via sistema de lodos ativados.

Após equalização, o efluente é enviado a uma caixa de mistura acoplada a um tanque onde são adicionados sulfato de alumínio, resina e polieletrólitos, respectivamente. As partículas que geram a coloração no efluente são adsorvidas pelo polieletrólito, formando flocos que são direcionados para o decantador físico-químico, sendo que a massa sólida do decantador é lançada para um tanque de mistura, com adição de cal para posterior passagem pelo filtro prensa. O líquido sobrenadante é encaminhado ao processo de lodos ativados, onde recebe também o esgoto oriundo da própria indústria. O lodo gerado é separado no decantador biológico, parte retorna ao sistema e parte é encaminhada ao filtro prensa para posterior destinação final (CETESB, 2001).

O sistema apresenta uma eficiência relativamente alta, permitindo a remoção de aproximadamente 80% da carga de corantes. Infelizmente, o problema relacionado com o acúmulo de lodo torna-se crítico, uma vez que o teor de corantes adsorvido é bastante elevado, impedindo o seu reaproveitamento (Kunz *et al.*, 2002).

3.2.1. Processos Oxidativos Avançados

Os Processos Oxidativos Avançados (POA) têm sido descritos como uma alternativa para remoção de poluentes persistentes e de efluentes com elevada carga orgânica, quando os tratamentos convencionais não alcançam a eficiência necessária (Amorim *et al.*, 2009). Os POAs são baseados na produção *in situ* de espécies oxidantes como as hidroxilas (OH^\cdot) que provocam uma seqüência de reações capazes de quebrar as moléculas em produtos menos nocivos e, em muitos casos, mineralizá-las (Rauf e Ashraf, 2009).

Os radicais hidroxil têm potencial de oxidação de 2,8 V, inferior apenas ao flúor (3,03 V) e podem ser gerados por vários métodos, incluindo processos envolvendo oxidantes fortes como o ozônio e peróxido de hidrogênio, semicondutores como dióxido de titânio e óxido de zinco e radiação. Os principais POAs são representados na TABELA 4 (Wojnárovits *et al.*, 2008).

TABELA 4. Principais Processos Oxidativos Avançados

Métodos	Espécies reativas
Tratamento com Ozônio: O ₃ ou O ₃ /H ₂ O ₂	$\cdot\text{OH}$, $\text{HO}_2\cdot/\text{O}_2^-\cdot$, $\text{O}_3^-\cdot$
Processo Fenton: H ₂ O ₂ /Fe ⁺² ou H ₂ O ₂ /O ₃ /Fe ⁺² (meio ácido)	$\cdot\text{OH}$, $\text{HO}_2\cdot/\text{O}_2^-\cdot$, $\text{O}_3^-\cdot$
Processo Foto-Fenton usando UV na indução	$\cdot\text{OH}$
Foto-oxidação induzida por UV ($\lambda = 185\text{nm}$ e 254nm) ou UV/O ₃ , UV/H ₂ O ₂ e UV/O ₃ /H ₂ O ₂ , respectivamente, usando lâmpada de Hg de baixa pressão, por exemplo	$\cdot\text{OH}$, $\text{HO}_2\cdot/\text{O}_2^-\cdot$, $\text{O}_3^-\cdot$
Tratamento de Fotocatálise: UV/luz vis usando TiO ₂ , ZnO, etc como catalisador	$\cdot\text{OH}$
Oxidação de poluentes induzidas pela radiação usando elétrons acelerados, raios γ e raios X; efeito sinérgico na presença de O ₃ /O ₂ , eventualmente H ₂ O ₂ como aditivo	$\cdot\text{OH}$, $\text{HO}_2\cdot/\text{O}_2^-\cdot$, $\text{O}_3^-\cdot$, e_{aq}^- , $\text{H}\cdot$
Oxidação Eletroquímica	
Tratamento Ultrasônico (sonólise da água)	$\cdot\text{OH}$, $\text{H}\cdot$
Oxidação Térmica usada para efluentes industriais	

Fonte: Wojnárovits *et al.*, 2008

Resultados promissores têm sido obtidos utilizando Processos Oxidativos Avançados (POA) no tratamento de efluentes coloridos nos últimos anos (Arslan-Alaton, *et al.*, 2008; Sadik, 2007; Hammami *et al.*, 2007; Oliviero *et al.*, 2003). Em águas residuárias coloridas, os radicais hidroxil atacam as ligações azo insaturadas do grupo cromóforo, promovendo a descoloração do efluente (Hsueh *et al.*, 2005).

A vantagem do uso dos POAs em relação aos demais processos é que não ocorre a transferência de fase do poluente e não há produção de lodo contaminado (Gözmen *et al.*, 2009). São processos limpos e não seletivos, podendo degradar inúmeros compostos independente da presença de outros. Além disso, podem ser usados para destruir compostos orgânicos tanto em fase aquosa como em fase gasosa ou adsorvidos numa matriz sólida (Teixeira e Jardim, 2004).

De acordo com Teixeira e Jardim, 2004 os POAs também se destacam por:

- ✓ Mineralizar o poluente e não somente transferí-lo de fase;
- ✓ Serem muito usados para compostos refratários a outros tratamentos;
- ✓ Transformar produtos refratários em compostos biodegradáveis;
- ✓ Serem usados com outros processos (pré e pós tratamento);
- ✓ Apresentar forte poder oxidante, com reação cinética elevada;
- ✓ Mineralizar o contaminante e não formar subprodutos, quando usado oxidante suficiente;
- ✓ Geralmente melhorar as qualidades organolépticas da água;
- ✓ Em muitos casos, consumir menos energia, acarretando em menor custo;
- ✓ Possibilitar tratamento *in situ*.

Tratando-se de um processo destrutivo, podem ser gerados produtos intermediários oriundos da não mineralização (formação de dióxido de carbono (CO₂) e espécies inorgânicas) de contaminantes orgânicos complexos. Esses produtos podem provocar maiores danos biológicos que o composto original, com isso, os ensaios de toxicidade são uma importante ferramenta para avaliar as condições de operação do POA (Rizzo, 2011).

Kusvuran *et al.*, 2004, avaliaram a degradação do corante Reativo Vermelho 120 (20 - 100 mg L⁻¹) utilizando diferentes POAs. A toxicidade do corante foi avaliada com *P. putida* durante os tratamentos e nenhum efeito foi observado no crescimento bacteriano. Em 2005, os autores estudaram os produtos de degradação do corante Reativo Preto 5 (20 - 100 mg L⁻¹) com *P. putida* e verificaram que a toxicidade aumentou após 15 min de tratamento com os POAs. A toxicidade diminuiu após 90 min, apenas, com os tratamentos eletro-fenton e UV/eletro-fenton.

Osugi *et al.*, 2006, estudaram a oxidação fotoeletrocatalítica do corante Remazol Azul Turquesa 15. O corante original e oxidado não apresentaram atividade mutagênica, entretanto, após o tratamento foi observado um aumento da toxicidade para *V. fischeri*, explicado pela liberação do cobre durante o tratamento.

Meriç *et al.*, 2004, trataram o corante Reativo Preto 5 (100 mg L⁻¹) com o processo oxidativo de fenton e não observaram toxicidade com *D. magna* ao final do tratamento.

Vajnhandl e Le Marechal, 2007, utilizaram o processo de ultra-som para descolorir e metabolizar o corante Reativo Preto 5 (5 - 300 mg L⁻¹). Após 6 horas não foi observada nenhuma toxicidade aguda em *V.fischeri* e baixa eficiência na degradação do corante, indicando que o tratamento utilizado sozinho foi ineficiente na degradação.

Satuf *et al.*, 2011, estudaram o modelo cinético de degradação fotocatalítica (UV/TiO₂) do corante Ácido Laranja 7 e verificaram um aumento na biodegradabilidade e diminuição da toxicidade em *V.fischeri* após o tratamento.

3.3. Radiação de Feixe de Elétrons

As pesquisas com a utilização de radiação ionizante na área ambiental iniciaram na década de 50, principalmente, com a desinfecção de lodos para possível reuso na agricultura. Em 1960, os estudos avançaram para o tratamento de água e efluentes domésticos. Na década de 1970 e 1980 foram conduzidos estudos em laboratório com efluentes industriais e água subterrânea. E na década de 1990 já se encontravam algumas plantas piloto instaladas. Atualmente, diversos países vêm estudando e, em alguns casos, já fazendo uso da radiação ionizante na área ambiental para o tratamento de água, efluentes, desinfecção de lodos e diversos poluentes orgânicos persistentes (POPs) (IAEA, 2007).

Um destaque é para a instalação de uma planta completa em Daegu, na República da Coreia, em 2005. Esta planta está localizada num complexo têxtil industrial, com capacidade de tratar 10000 m³ por dia de águas residuais, utilizando um acelerador de elétrons de 1 MeV, 400 kW combinado com sistema biológico. Esse projeto foi baseado na instalação de uma planta piloto, em funcionamento desde 1998, com capacidade de tratar 1000 m³ por dia de efluentes têxteis utilizando irradiação de feixes de elétrons combinado com tratamento biológico, onde ficou demonstrado uma redução em aditivos químicos e no tempo de retenção e um aumento na remoção da DQO e DBO de até 30 a 40 % (IAEA, 2007).

No Brasil, o Centro de Tecnologia das Radiações (CTR) situado no Instituto de Pesquisas Energéticas Nucleares (IPEN) possui uma planta piloto construída em 1993 com capacidade de tratar 3 m³ por hora de efluentes, utilizando acelerador de elétrons de 1,5 MeV, 37,5 kW. Diversos trabalhos vêm demonstrando a eficiência do uso da radiação ionizante em aplicações

ambientais (Sampa *et al*, 1995, Borrely *et al*, 1998, Sampa *et al*, 1998, Duarte *et al*, 2000, Rela *et al*, 2000 Borrely, 2000, Duarte *et al*, 2002, Duarte *et al*, 2004, Moraes *et al*, 2004, Romanelli *et al*, 2004, Duarte *et al*, 2007, Duarte *et al*, 2009).

O tratamento de efluentes com radiação ionizante pode ser realizado utilizando fontes de raios gama (Cobalto-60 e Césio-137) e aceleradores de elétrons. Atualmente os aceleradores de elétrons são preferencialmente utilizados para aplicações ambientais, apresentando vantagens como taxa de dose alta, maior rendimento de energia, licenciamento similar às máquinas de Raio X e sistema liga e desliga que cessa a emissão de radiação ionizante. Entretanto, a baixa penetração dos feixes de elétrons e a necessidade de operadores especializados são as principais desvantagens (Getoff, 1996, Duarte, 1999, Romanelli, 2004).

Um acelerador de partículas pode ser definido como um equipamento que aplica forças a partículas carregadas por meio de alguma combinação de campos elétricos e magnéticos, gerando íons de alta velocidade e alta energia cinética. Quando se estabelece um potencial de alta voltagem entre cátodo e ânodo, no vácuo, o cátodo emite feixe de elétrons, chamados de raios catódicos ou feixes eletrônicos, seguindo o mesmo princípio do tubo de televisão, onde a diferença fundamental é que este último utiliza 25.000 volts de energia, aproximadamente, enquanto o acelerador utiliza da ordem de milhões de volts (FIGURA 2) (Bly, 1988).

No acelerador de elétrons, uma fonte de alta tensão fornece os elétrons que serão acelerados (Harvey, 1969). De acordo com a disposição geométrica dos campos eletromagnéticos responsáveis pela aceleração das partículas, os aceleradores são classificados em lineares ou cíclicos. Os principais componentes de um acelerador são: fonte de alta tensão, tubo acelerador em vácuo, canhão de elétrons, câmara de irradiação, painel de controle e sistema de segurança, que devem ser blindados para barrar a passagem dos raios X gerados pelo freamento dos elétrons ao penetrarem na matéria (Romanelli, 2004).

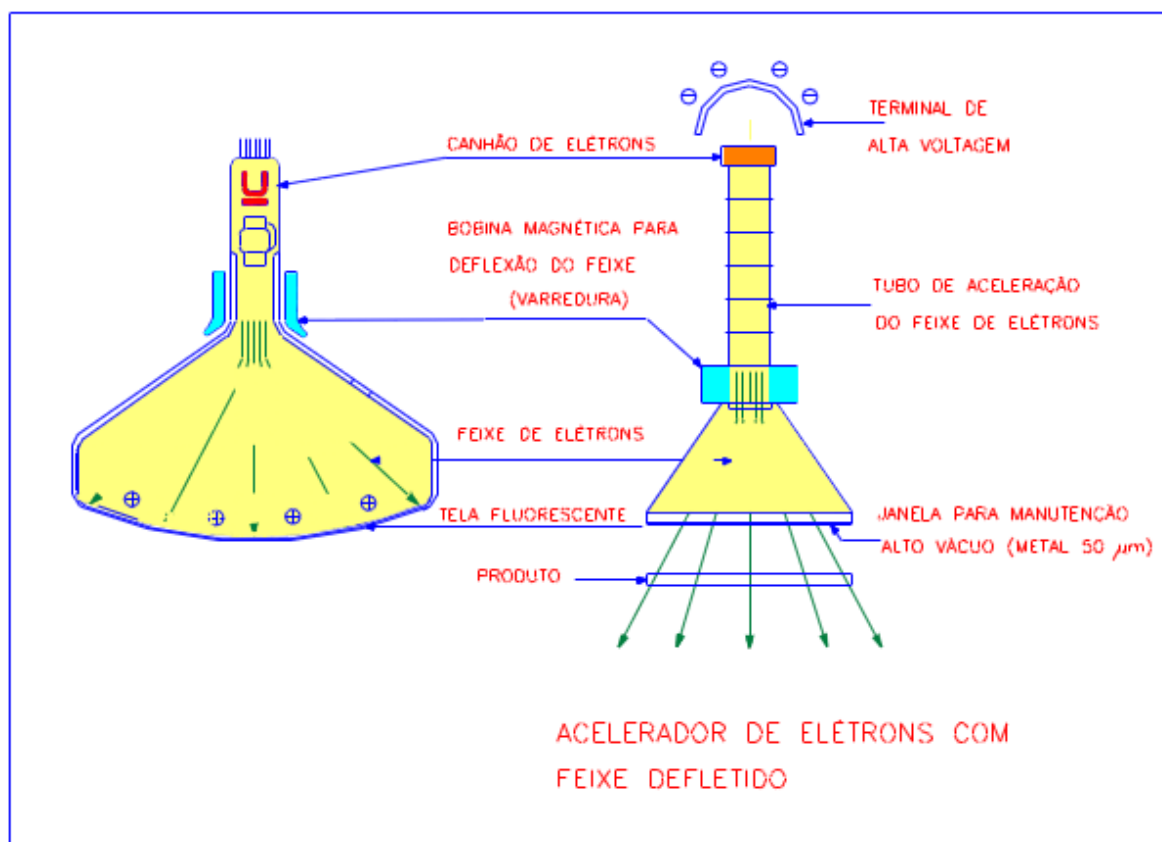


FIGURA 2. Comparação entre o acelerador de elétrons e o tubo de televisão

Fonte: Borrely, 2001

A faixa de energia dos aceleradores de elétrons utilizados para a aplicação ambiental está entre 0,5 - 10 MeV. Elétrons de baixa energia menor que 0,5 MeV são inadequados devido à sua baixa penetração, enquanto elétrons de energia acima de 10 MeV podem induzir radioatividade ao material irradiado. A potência do feixe (produto entre a energia de elétron e a corrente) varia entre 5 - 600 kW, embora aceleradores com maior potência (1MW ou mais) são esperados no futuro. Aceleradores de média energia produzem elétrons de energia entre 0,5 - 5 MeV e potência de até 400-600 kW. Esses aceleradores são utilizados para o tratamento de efluentes e de gases emitidos contendo NO_x e SO_x . Os aceleradores de 5 - 10 MeV geralmente são utilizados para desinfecção de lodos e, em menor grau, para o tratamento de resíduos perigosos. A escolha do acelerador tem implicação direta no custo de implantação do sistema de tratamento (IAEA, 2008).

3.3.1. Interação da Radiação com a Matéria

A radiação de feixe de elétrons é um processo físico-químico classificado como processo oxidativo avançado (POA). O processo é fundamentado na interação da radiação ionizante, produzida por um acelerador de elétrons, com o substrato.

A radiação ionizante interage com a matéria transferindo sua energia para os elétrons dos átomos do material irradiado. Os elétrons podem ser ejetados dos átomos, caso a energia transferida seja superior à energia de ligação do elétron com sua estrutura atômica, gerando íons positivos e elétrons livres (íons negativos). Ou podem ser movidos para camadas mais externas (de maior energia), quando a energia transferida não é suficiente para arrancar os elétrons dos átomos, gerando átomos ou moléculas excitadas. Esse fenômeno físico consiste na ionização e excitação dos átomos e se processa num intervalo de tempo da ordem de 10^{-13} a 10^{-12} s. Os íons positivos, elétrons e espécies excitadas são os precursores de qualquer mudança química no material irradiado. Nessa segunda fase de interação, ocorrem os efeitos químicos, podendo ocorrer rupturas de ligações nas moléculas e formação de radicais livres, num intervalo de tempo de aproximadamente 10^{-9} s (Cooper *et al*, 1998, Duarte, 1999).

Em todos os processos de irradiação ionizante é fundamental que se conheça a quantidade de energia absorvida pelo material quando ele é exposto a um campo de radiação, onde os efeitos físicos, químicos e biológicos são dependentes da quantidade de interações dessa energia com o meio. De acordo com o Sistema Internacional de Medidas, a dose de radiação absorvida é definida pela relação entre a energia absorvida pela massa de material exposta a um campo de radiação, representado por Joule por quilograma (J kg^{-1}) e recebe um nome especial, Gray (Gy). A relação entre essas unidades é definida por: $1 \text{ J kg}^{-1} = 1 \text{ Gy} = 100 \text{ rad}$ (Harvey, 1969).

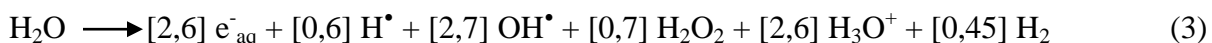
3.3.2. Radiólise da Água

A degradação de compostos orgânicos e inorgânicos pode ocorrer pela interação direta da radiação ionizante com os compostos ou pelo efeito indireto, com a interação da radiação com a molécula de água (radiólise) gerando espécies químicas reativas que, por difusão, interagem com os compostos. Para compostos puros, os efeitos resultantes são provenientes principalmente da

ação direta, mas em soluções e efluentes líquidos o principal mecanismo é a ação indireta da radiação, sendo insignificante o efeito direto.

A irradiação de alta energia produz transformações radiolíticas na molécula da água. A energia transferida dos elétrons acelerados provoca distúrbios no sistema de elétrons da molécula da água (ionização e excitação) gerando produtos químicos altamente reativos e de pequena meia vida (menor que 1 μ s) (IAEA, 2007).

Os principais produtos químicos reativos gerados pela radiólise da água são os e^-_{aq} , H^\bullet , OH^\bullet e os produtos moleculares H_2O_2 e H_2 . Os produtos são formados na seguinte proporção:



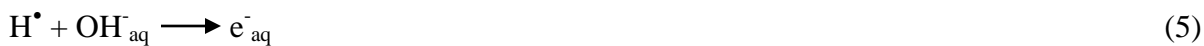
O rendimento das espécies formadas a partir da absorção da energia pelas moléculas da água pode ser mensurado, sendo expresso com valor de G (mol J^{-1}) e significa o número de radicais, moléculas ou íons que são formados (ou destruídos) em uma solução pela absorção de 100 eV de energia incidente (Borrely, 2001).

Os respectivos valores de G estão representados na equação 3 e são dependentes do pH da solução.

Em meio ácido o e^-_{aq} é convertido em átomo de hidrogênio.



Em meio básico os átomos de hidrogênio são transformados em e^-_{aq} e os radicais OH^\bullet dissociam-se.



Na presença de ar ou soluções com oxigênio saturado ocorre a captura do e^-_{aq} e H^\bullet pelo oxigênio gerando os radicais ânion superóxido e perhidroxil.

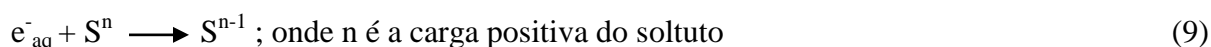


Os radicais gerados na radiólise interagem entre si e com os compostos orgânicos e inorgânicos presentes no efluente (Getoff, 1999, Romanelli, 2004). Assim, os processos químicos básicos (oxidação, redução, dissociação ou degradação) vão ocorrer, principalmente, pela reação do composto orgânico com as espécies geradas (Paul *et al*, 2011).

As propriedades e característica dessas espécies são discutidas a seguir (Buxton *et al.*, 1998):

Elétron Aquoso

O elétron aquoso é um potencial agente redutor (- 2,9 V) e seu modo de ação pode ser representado na transferência de um elétron.



O elétron aquoso atua como nucleofílico em suas reações com moléculas orgânicas. Sua reatividade é aumentada pelos elétrons substituintes adjacentes à ligação dupla de alcenos ou ligados a anéis aromáticos. Também é observada quando as moléculas orgânicas contem átomos halogenados.



Átomo de Hidrogênio

O átomo de hidrogênio reage com moléculas orgânicas pela abstração de H de moléculas saturadas e pela adição de centros de insaturação, como por exemplo:



O processo de feixe de elétrons é o único a formar esse radical.

Radical Hidroxila

O radical hidroxil é o mais potente agente oxidante, tendo um potencial redox de 2,8 V em solução ácida e 1,8 V em solução neutra, onde a energia livre de neutralização do OH^- pelo H^+ não é disponível. A reação do OH^\bullet com íons é representada pela simples transferência de elétrons.



Se S for um íon halogênio teremos:



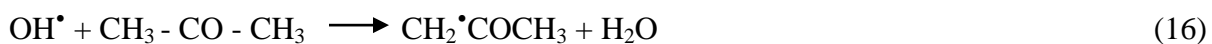
O S_2^- pode reagir com moléculas orgânicas e formar compostos orgânicos halogenados.

O OH^\bullet pode reagir de várias formas com substâncias químicas em solução aquosa, os tipos mais comuns são: adição, abstração de hidrogênio, transferência de elétrons e recombinação radical-radical.

Reações de adição ocorrem prontamente com compostos aromáticos e alifáticos insaturados.



Reações de abstrações ocorrem com moléculas saturadas e insaturadas, como aldeídos e cetonas.



Peróxido de Hidrogênio

A principal reação resultante da formação do H_2O_2 é a recombinação radical-radical envolvendo OH^\bullet .



Também pode ocorrer a dissociação do H_2O_2 :



Especificamente na interação da radiação ionizante com efluentes líquidos, a decomposição completa de um poluente é dependente de vários fatores tais como, a reatividade dos produtos primários da radiólise da água, a presença de sais inorgânicos, os compostos orgânicos, a estrutura da molécula, a temperatura, o pH, a concentração de oxigênio, a dose e a taxa de radiação (Las Casas, 2004).

As principais vantagens do uso do tratamento utilizando a radiação ionizante sobre os demais tratamentos convencionais e POAs são:

- ✓ Produção de espécies reativas capazes de oxidar e reduzir na mesma proporção em meio aquático;
- ✓ O processo pode ser utilizado simultaneamente para controle o biológico e de substâncias químicas perigosas recalcitrantes;
- ✓ Não há necessidade de utilizar nenhuma substância química;
- ✓ O processo é rápido, limpo e permite flexibilidade para o design da planta;
- ✓ Os aceleradores necessitam apenas de eletricidade para operar;
- ✓ Os sistemas são totalmente automatizados para facilitar a operação.

3.3.3. Custo do Tratamento com Feixe de Elétrons

Segundo Rela, 2004, a viabilidade da utilização da tecnologia de processamento de efluentes com feixe de elétrons depende, na maior parte, do custo do tratamento, que, por sua vez, depende da eficiência do processo e dos equipamentos e instalações necessárias para sua utilização. Para um estudo de viabilidade econômica com o propósito de determinar a melhor relação custo-benefício faz-se necessário definir a dose requerida para o tratamento e a vazão do efluente. A partir destes dados, o tipo de acelerador a ser utilizado é definido e os custos operacionais são determinados de modo a obter o custo unitário para o tratamento de um metro cúbico do efluente.

Segundo IAEA, 2008, para competir com outros processos, em termos econômicos, o uso do potencial do sistema de feixe de elétrons deve objetivar a redução das doses necessárias, a melhoria da eficiência e a redução do custo do acelerador de elétrons.

Gehring, 2004, realizou um estudo para avaliar o custo para a implantação de uma estação de tratamento com o sistema biológico combinado com O_3 e, outra, com o uso de feixe de elétrons combinado com O_3 . Após a análise do custo inicial de implantação e o custo de operação de cada estação de tratamento, o autor definiu o custo unitário para o tratamento de um metro cúbico do efluente a ser tratado, sendo $3,7 \$ / m^3$ o custo total do feixe de elétrons com ozônio e $3,5 \$ / m^3$ o custo total para o sistema biológico com ozônio. O autor concluiu que as duas formas de tratamento foram eficazes no tratamento do efluente, a estimativa de custo favoreceu o sistema biológico com ozônio, porém, o tratamento com feixe de elétrons e ozônio não gerou rejeito sólido (lodos).

3.3.4. Degradação de Corantes e Efluentes Têxteis Utilizando Radiação de Feixe de Elétrons

A maioria dos estudos tem como objetivo entender o processo de descoloração e degradação dos corantes em solução aquosa, utilizando técnicas de radiólise de pulso (Pálfi *et al.*, 2007; Dajka *et al.*, 2003; Földváry *et al.*, 2007; Wojnárovits *et al.*, 2008). Poucos trabalhos têm sido realizados utilizando feixe de elétrons na descoloração de corantes com estrutura definida.

Wang *et al.* 2006, avaliou a descoloração e degradação por feixe de elétrons de dois corantes reativos (Reactive Red KE-3B e Reactive Blue XBR). O estudo demonstrou maior eficácia na redução da cor e DQO ao combinar a radiação com feixe de elétrons com H_2O_2 .

Ting *et al.*, 2008, utilizaram a radiação de feixe de elétrons para degradar um efluente têxtil composto por corantes reativos (80-90 %) e corantes dispersos (10-20 %). O estudo demonstrou que a concentração do poluente e a dose de irradiação aplicada para remover a cor e a DQO são dependentes uma da outra.

Vahdat *et al.*, 2010, estudou a descoloração e degradação do corante Direto Preto 22. No trabalho os autores evidenciaram a direta influência da concentração inicial do corante na eficácia da taxa de dose de feixe de elétrons necessária para descoloração, diminuição de DQO e pH.

A melhoria na eficiência e a redução na dose de radiação podem ser alcançadas combinando-se o tratamento de feixes de elétrons com outros processos. Além de Wang *et al.* 2006, já citado anteriormente, Kim *et al.* 2007, aplicaram a radiação de feixe de elétrons como pré-tratamento para o processo de lodos ativados. O estudo demonstrou que doses baixas (1 kGy) foram suficientes para aumentar a biodegradabilidade do efluentes têxteis. Após a radiação os compostos orgânicos foram convertidos em compostos moleculares menores, melhorando a eficiência do processo biológico e reduzindo seu custo de operação.

Duarte *et al.*, 2000 utilizaram a radiação de feixe de elétrons no tratamento de efluentes provenientes de cinco diferentes etapas de uma estação de tratamento de esgotos que também recebia 20 % de efluentes industriais. A radiação foi eficaz na remoção de trihalometanos, tetracloroetileno (PCE), tricloroetileno (TCE), corantes e outros. Entretanto, não evidenciaram significativas mudanças na DQO e DBO, porém, os compostos gerados foram menos tóxicos (Borrely *et al.*, 2001). Os autores sugerem a utilização de 20 kGy para o tratamento do efluente industrial antes da entrada na estação ou 5 kGy para o tratamento do efluente final, após o tratamento biológico.

3.4. Legislação Relacionada ao Lançamento de Efluentes

A Resolução Federal CONAMA nº 357 de 17.03.2005 estipula normas e procedimentos sobre a classificação dos corpos de água e seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes a serem obedecidos tanto pelos usuários das águas como pelos órgãos ambientais.

A resolução classifica as águas doces, salobras e salinas em função dos usos preponderantes atuais e futuros. A cada classe corresponde um elenco de usos, reunidos de acordo com o grau de exigência com relação à qualidade que a água deve possuir para atender aos seus usos preponderantes ali definidos. No total são definidos 11 classes, sendo 5 para as águas doces, 3 para as águas salinas e 3 para as salobras.

Para cada classe são estabelecidos padrões de qualidade que as águas deverão possuir para atender os usos. Os padrões são menos restritivos para as classes destinadas a usos menos nobres.

Além dos padrões de qualidade, a Resolução CONAMA n° 357 fixa os padrões de emissão que devem ser obedecidos pelos efluentes lançados direta ou indiretamente nos corpos de água, por quaisquer fonte de poluição. Recentemente tal Resolução foi alterada e complementada pela Resolução CONAMA n° 430 de 13.05.2011 (artigo n° 16). Tais padrões devem ser sempre respeitados, independentemente da classe do corpo receptor, pelo que se constituem nos requisitos mínimos a serem atendidos pelas atividades poluidoras. E esse lançamento não pode conferir ao corpo receptor características em desacordo com as metas obrigatórias progressivas, intermediárias e finais do seu enquadramento.

Importante destacar que a Resolução exige a realização de ensaios ecotoxicológicos definidos pelo órgão ambiental competente e não define a concentração de corantes antes do lançamento do efluente. Os órgãos ambientais também podem estabelecer em caráter geral ou individualmente a carga poluidora máxima para o lançamento de substâncias passíveis de estarem presentes ou serem formadas nos processos produtivos, constantes ou não dos padrões de emissão por ela fixados, seja no licenciamento da atividade ou por norma específica, objetivando o cumprimento das metas estabelecidas para o enquadramento do corpo de água.

No Estado de São Paulo, o Regulamento Lei 997 de 31.05.1976 aprovada pelo Decreto n° 8.468 de 08.09.1976 estabelece a classificação das águas de acordo com seus usos preponderantes e os padrões de qualidade que as mesmas devem atender.

O Decreto 8.568/76, em seus artigos n° 17 e 18, também estabelece as normas e os padrões de lançamento de efluentes em corpos de água e redes de esgoto. Dentre os diversos parâmetros, a norma exige a redução de 80 % da carga orgânica ou que a DBO apresente concentração máxima de 60 mg O₂/L para lançamento do efluente no corpo de água receptor. O artigo n° 19 determina que quando houver sistema público de esgotos, em condições de atendimento, os efluentes de qualquer fonte poluidora deverão ser nele lançados. Tratando-se de uma obrigação a ser cumprida pelas empresas e particulares, e não de uma faculdade.

Os artigos de n° 19A ao 19F estabelecem os parâmetros e condições de lançamento dos efluentes em rede, exigindo um pré- tratamento, considerando a existência ou não de sistema de tratamento implantado pelo gestor do serviço público de águas e esgotos, do fato de esse sistema já estar em fase de planejamento ou ter sido aprovado pelos órgãos competentes, embora ainda

não implantado. Também estabelece as condições técnicas para o lançamento dos efluentes na rede.

Assim como na Legislação Federal o controle da presença de corantes é realizado no corpo de água receptor, onde em águas de classe 1 não pode haver despejo de efluentes industriais, mesmo tratados; classes 2 e 3 são proibidos a presença de corantes que não sejam removíveis por processo de coagulação, sedimentação e filtração convencionais e classe 4 não há restrições.

A Resolução SMA n° 3 de 22.02.2000 acrescenta outras exigências para os efluentes, considerando eventuais interações entre as substâncias presentes no efluente. Esta Resolução determina que o efluente não deverá causar ou possuir potencial para causar efeitos tóxicos aos organismos aquáticos no corpo receptor, de acordo com as relações que fixam a toxicidade permissível, estabelecendo a fórmula e critérios de cálculo para avaliar se os limites de toxicidade estão sendo observados.

$$DER \leq \frac{CE(50)}{100} \text{ ou } \frac{CL(50)}{10} \text{ ou } DER \leq \frac{CENO}{10} \quad (18)$$

Onde:

$$DER = \frac{\text{Vazão Média do Efluente} \times 100}{\text{Vazão Média do Efluente} + Q_{7,10} \text{ do Corpo Receptor}} \quad (19)$$

DER = Diluição do efluente no corpo receptor, em %

CE(50) = Concentração do efluente que causa efeito agudo a 50 % dos organismos aquáticos, em um determinado período de tempo, em %

CL(50) = Concentração do efluente que causa efeito agudo (letalidade) a 50 % dos organismos aquáticos, em um determinado período de tempo, em %

CENO = Concentração do efluente que não causa efeito crônico observável, em %

3.5. Aspectos Ambientais dos Corantes Têxteis

Considerando-se os corantes de um modo geral, além dos pigmentos propriamente ditos, estima-se que 15% da produção mundial é perdida para o meio ambiente durante a síntese, processamento ou aplicação desses corantes, representando aproximadamente um lançamento de

cerca de 128 toneladas por dia. A principal fonte dessa perda está nos resíduos líquidos da indústria têxtil, devido a incompleta exaustão dos corantes (10-20% de perda) (Zollinger, 2003).

A problemática ambiental associada ao efluente têxtil é bastante conhecida. Pela sua própria natureza, a presença dos corantes é facilmente detectada, sendo visíveis mesmo em concentrações menores que 1 mg L^{-1} . Quando lançados nos corpos d'água sem tratamento adequado, podem alterar a coloração das águas e diminuir a fotossíntese no sistema, alterando o regime de solubilização dos gases pela diminuição da penetração da luz e podem apresentar toxicidade aos organismos aquáticos; se o corante sofrer degradação biótica ou abiótica, seus metabólicos podem ser mutagênicos ou carcinogênicos (Kunz *et al.*, 2002). Além disso, os corantes reativos são configurados para reagirem eficientemente com substâncias portadoras de amino e hidroxila presentes nas fibras, porém, também presentes em todos os organismos vivos constituídos de proteínas, enzimas, entre outras (Guaratini e Zanoni, 2000).

Umbuzeiro *et al.*, 2005, identificaram, utilizando o teste de Salmonella/Microsoma (teste de Ames), que corantes dispersos contribuíram para atividade mutagênica no Rio Ribeirão dos Cristais no Brasil.

Ohe *et al.*, 2008, verificaram a presença de mutagênicos indiretos, 3,3'- Diclorobenzidina e 5-nitro-Diclorobenzidina, presentes na água rio Waka, no Japão. Esses compostos são produzidos como matéria prima para produção de polímeros e intermediários de corantes.

Watanabe *et al.* 2006, identificaram a presença de compostos mutagênicos derivados de corantes dinitrofenilazo (PBTAs) nas águas de três rios no Japão.

3.6. Aspectos Ecotoxicológicos dos Corantes Têxteis

A avaliação dos efeitos biológicos de poluentes químicos se baseia principalmente nos ensaios de toxicidade aguda e crônica. A letalidade e a imobilização em organismos jovens são os parâmetros mais usados nos ensaios de toxicidade aguda, que se caracterizam pela curta duração e esquema experimental simples. Os ensaios de toxicidade crônica permitem avaliar efeitos adversos após exposições prolongadas a concentrações subletais dos contaminantes aquáticos (Doust *et al.*, 1994; Cooney, 1995).

Os protocolos de estudos ecotoxicológicos recomendam a realização de ensaios de toxicidade aguda e crônica com três espécies de organismos aquáticos representativas de níveis tróficos distintos (Rand *et al.*, 1995).

Os ensaios de toxicidade consistem em expor organismos representativos durante um período de tempo determinado, a várias concentrações de uma ou mais substâncias e avaliar os efeitos causados. Os efeitos tóxicos vão desde a mortalidade até os efeitos subletais, tais como mudanças no crescimento, no desenvolvimento, na reprodução, no comportamento, etc. Os efeitos deletérios podem ser de dois tipos, agudo ou crônico (Abrahão *et al.*, 2002).

Mais de 90% dos 4.000 corantes testados pela Ecological and Toxicological Association of the Dyestuffs Manufacturing Industry (ETAD) apresentaram altos valores de toxicidade. Vários corantes ácidos, básicos e diretos com grupamento azo têm sido classificados como tóxicos para peixes, crustáceos, algas e bactérias, enquanto os corantes azo reativos têm elevados valores de concentração efetiva ($CE_{50} > 100 \text{ mg L}^{-1}$) e não são considerados tóxicos (Novotny *et al.*, 2005).

A toxicidade dos corantes tem sido relacionada ao seu caráter hidrofóbico. A diminuição da toxicidade tem sido alcançada com a introdução de grupos polares na estrutura dos corantes, tornando-os mais solúveis em água. Os corantes azo reativos são caracterizados por apresentar grupos sulfônicos em sua estrutura e, por isso, amplamente solúveis em água (Pinheiro *et al.*, 2004).

Apesar dos corantes azo reativos apresentarem baixa toxicidade aguda, pouco se sabe sobre os efeitos causados pelas formas vinilsulfona e hidroxietilsulfona e da exposição prolongada desses compostos. Além disso, apresentam o grupamento azo que pode sofrer redução e, dependendo da sua estrutura, liberar compostos mutagênicos.

Weber *et al.*, 1990, identificaram a presença do corante Reativo Azul 19 na forma vinilsulfona e hidroxietilsulfona no efluente têxtil. Após o tratamento do efluente, apenas a forma vinilsulfona foi detectada, estimando que cerca de 25 % do corante não era eficientemente removido pelo tratamento biológico. O autor demonstrou que o corante na forma vinilsulfona tem uma meia-vida de aproximadamente 46 anos em águas naturais e que pode se ligar a superfície do sedimento pelo mesmo mecanismo que se liga a fibra, com meia-vida de 2,5 dias no sedimento anaeróbio. O estudo demonstrou que os corantes reativos podem permanecer por longo tempo no ecossistema aquático.

Nilratnisakorn *et al.* 2007, estudaram um efluente sintético com corantes reativos e verificaram efeitos tóxicos utilizando a planta *Thyfa angustifolia* como bioindicador.

Tigini *et al.* 2011 (“article in press”), avaliaram a toxicidade de quatro diferentes efluentes têxteis sintéticos com diferentes organismos. Todos os efluentes testados apresentaram toxicidade, entretanto, o efluente contendo corantes reativos foi considerado o mais tóxico. Os autores verificaram um sinergismo entre os corantes reativos e a elevada concentração de sal desses efluentes, potencializando o efeito tóxico.

3.7. Aspectos Genotóxicos dos Corantes Têxteis

Grande parte dos estudos de toxicidade aquática tem gerado respostas com base em efeitos agudos. A inclusão de testes de mutagenicidade na avaliação da qualidade das águas vem sendo sugerida em decorrência da forte mistura de efluentes praticadas pelo setor produtivo que, freqüentemente, contém compostos mutagênicos (Claxton *et al.*, 1998; Ohe *et al.*, 2004).

A contaminação do ambiente por agentes que podem danificar o material genético de qualquer organismo apresenta um risco potencial à saúde pública e aos ecossistemas (Wurgler e Kramers, 1992; Anderson *et al.*, 1994). Os agentes mutagênicos podem atingir o homem por meio da cadeia alimentar ou do consumo da própria água. Em populações naturais, essa exposição poderá acarretar vários efeitos genéticos.

Vários testes *in vivo* e *in vitro* foram desenvolvidos para avaliar a capacidade mutagênica das substâncias químicas. O teste pioneiro foi desenvolvido por Ames em 1975 (Ames *et al.*, 1975), utilizando bactérias (*Salmonella*/ *Microsoma*). Esse teste tem sido útil na triagem de poluentes mutagênicos em amostras ambientais (Claxton *et al.*, 1998).

Outros testes também são realizados para estudos de mutagenicidade em água: indução de aductos de DNA, análise de aberrações cromossômicas numéricas e estruturais, troca de cromátides irmãs, teste do micronúcleo e o teste do cometa (Brunetti *et al.*, 1986; Hebert e Luiker, 1996; Mahata *et al.*, 2003; Bolognesi *et al.*, 2004; Skarpheoinndottir *et al.*, 2005).

O teste do cometa ou eletroforese em gel de células individuais é o método mais recente desenvolvido para detectar quebras no DNA. O ensaio detecta quebras na fita dupla, quebras na fita simples, sítios álcali-lábeis e quebras na fita simples associadas a sítios de reparo de excisão

incompleto em DNA, ligações cruzadas de DNA com DNA e DNA com proteínas e morte celular (apoptose e necrose) (Tice *et al.*, 2000).

A detecção de quebras na fita simples em DNA de células individuais foi descrita por Rydberg e Johanson, 1978. Nessa técnica as células são imersas em agarose e colocadas em lâminas de microscópio, em seguida lisadas sob condições levemente alcalinas para permitir o desenrolamento parcial do DNA. Após a lise, as lâminas são neutralizadas e coradas com acridine orange. A extensão do dano no DNA é quantificada medindo a taxa de fluorescência, de forma que a coloração verde indica quebra na fita dupla e a vermelha, quebra na fita simples.

Ostling e Johanson, 1984, foram os primeiros a introduzirem a técnica de microeletroforese para detectar danos no DNA de células individuais. As células são imersas em agarose e lisadas, em seguida submetidas a uma microeletroforese, fazendo com que o DNA migre para o ânodo devido à sua carga negativa. As células, após a lise, se apresentam como nucleóides e os fragmentos de DNA que sofreram dano apresentam um peso molecular baixo em relação à parte do DNA que apresentou pouco dano ou não sofreu dano algum (peso molecular alto). Durante a eletroforese, as partes mais leves migram primeiro em direção ao ânodo, formando uma cauda e as partes mais pesadas não migram. Assim, fragmentos livres do DNA danificado migram para além do nucleóide. As células são coradas com corante fluorescente específico para DNA e visualizadas por microscopia de fluorescência. Também pode ser utilizada microscopia a laser (confocal) para estudar a morfologia das células com e sem cometa (Bocker *et al.*, 1997).

Na microeletroforese realizada sob condições neutras ($\text{pH} \cong 9,5$), são detectados apenas quebras na fita dupla do DNA (Ostling e Johanson, 1984). No entanto, essas condições limitam a utilidade do teste. Singh e col., 1988 readaptaram esse procedimento usando condições alcalinas ($\text{pH} > 13$) promovendo o desenrolamento total do DNA. A partir dessa versão, com essa técnica é possível detectar quebras na fita simples, quebras na fita simples associadas a sítios de reparo de excisão incompleto e sítios álcali-lábeis em DNA de células individuais, oferecendo um aumento na sensibilidade do teste para identificar agentes genotóxicos.

Olive *et al.*, 1990, desenvolveram uma outra versão alcalina dessa técnica, nos quais o DNA passa por eletroforese num $\text{pH} 12,3$, permitindo detectar quebras na fita dupla e na fita simples em DNA de células individuais.

Por sua simplicidade e relativo baixo custo, o teste do cometa é promissor para avaliar produtos químicos em larga escala. O teste pode ser utilizado para estudos de genotoxicidade *in vitro* e *in vivo*, distinguir danos de compostos carcinogênicos de ação genotóxica e não genotóxica *in vivo*. Ele pode vir a integrar as baterias de testes *in vitro* e *in vivo* usadas para fins de regulamentação de produtos químicos (Tice *et al.*, 2000).

O teste do cometa também é considerado rápido e eficaz para o estudo de reparo de DNA, tanto na quebra da fita dupla, quanto quebras na fita simples para ambas as versões (neutra e alcalina). Na versão alcalina podem-se detectar sítios de reparo de excisão (McKelvey-Martin *et al.*, 1993; Rojas *et al.*, 1999, Speit *et al.*, 1999).

Esse teste foi aplicado com êxito em várias espécies de plantas, anelídeos, moluscos, peixes, anfíbios e mamíferos empregados como bioindicadores em estudos de biomonitoramento ambiental (Cotelle e Férard, 1999; Lee e Steinert, 2003).

3.8. Características dos Corantes Remazol Preto B 133% e Remazol Alaranjado 3R 133%

Os corantes reativos utilizados neste trabalho foram os corantes Remazol Preto B 133% (RPB) e Remazol Alaranjado 3R 133% (RA3R) fornecidos pela indústria DyStar do Brasil.

As características gerais e as estruturas químicas dos corantes estão representadas na TABELA 5 e nas FIGURAS 3 e 4, respectivamente.

TABELA 5. Características gerais dos corantes utilizados no trabalho

Corante	Remazol Preto B	Remazol Alaranjado 3R
Colour Index	Reactive Black 5 (20505)	Reactive Orange 16 (17757)
Fornecedor	DyStar	DyStar
Classe química (Cromóforo)	Reativo (Monoazo)	Reativo (Diazo)
Tipo	Álcali	Álcali
	Baixa substantividade	Baixa substantividade
Fórmula química	$C_{26}H_{21}N_5Na_4O_{17}S_6$	$C_{20}H_{17}N_3Na_2O_{11}S_3$
Absorbância $\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	597	493
Massa molecular (g mol^{-1})	959	617,54

Fonte: Gomes, 2009 e Donnaperna *et al.*, 2009

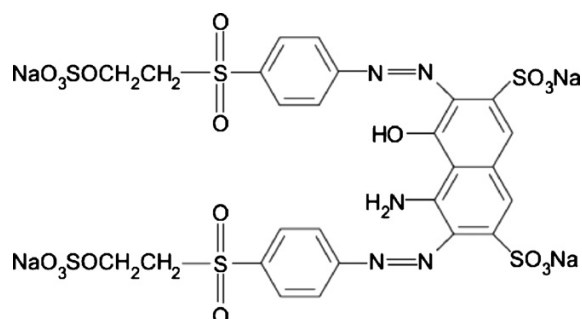


FIGURA 3. Estrutura química do corante Remazol Preto B 133% na forma sulfatoetilsulfona

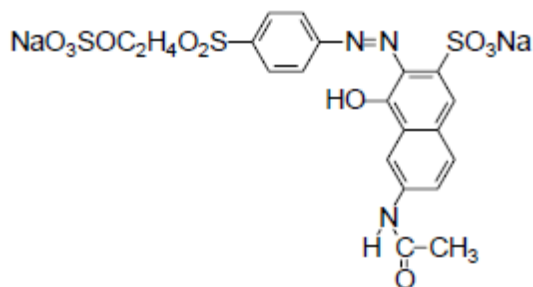


FIGURA 4. Estrutura química do corante Remazol Alaranjado 3R 133% na forma sulfatoetilsulfona

O corante R3AR apresenta dois grupos sulfonados em sua estrutura, quando em solução aquosa possuem carga negativa. Para sua produção são utilizados o PBE e o ácido gama

acetilado (FIGURA 5). O PBE é o agente precursor utilizado na preparação de grande parte dos corantes remazóis e ele apresenta o principal grupo funcional desses corantes (grupo sulfatoetilsulfanila).

O RPB apresenta estrutura química mais complexa com duas ligações azo, dois grupamentos reativos e quatro grupos sulfonados. Além do ácido H, também é utilizado o PBE para sua produção (FIGURA 6).

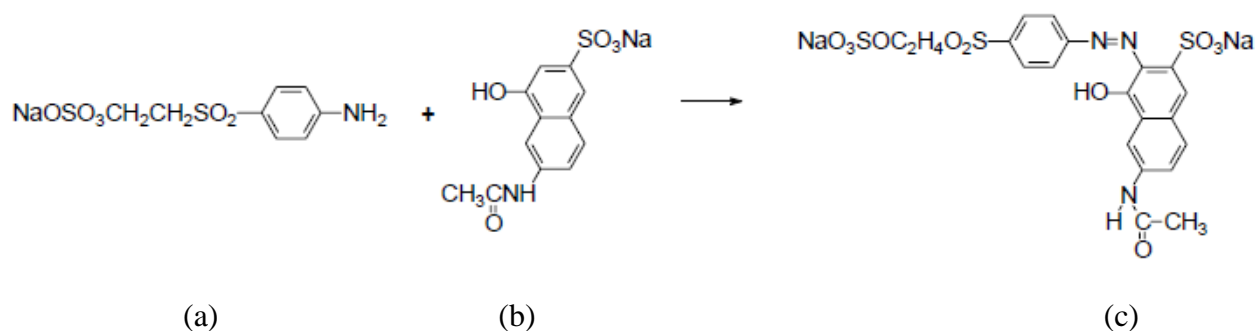


FIGURA 5. Reação entre o (a) para-base-ester e o (b) ácido gama acetilado para a formação do (c) corante têxtil Remazol Alaranjado 3R 133%

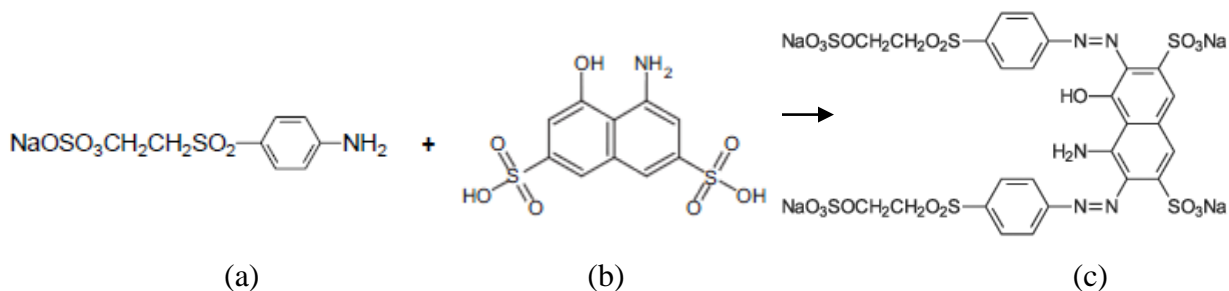


FIGURA 6. Reação entre o (a) para-base-ester e o (b) ácido H para a formação do (c) corante têxtil Remazol Preto B 133%

3.9. Organismos utilizados nos ensaios

A bactéria gram negativa *Vibrio fischeri* é amplamente utilizada para avaliar a toxicidade aguda de substâncias, efluentes, sedimentos e corpos d'água em muitos países. O ensaio baseia-se na medida da quantidade de luz emitida pela bactéria na presença e na ausência da amostra teste. A emissão de luminescência é diretamente proporcional a atividade metabólica da

população bacteriana, que libera energia na forma de luz. A inibição de qualquer enzima envolvida nesse processo irá causar a diminuição na quantidade de luz emitida. Os poluentes ambientais são relacionados com a indução ou supressão das atividades enzimáticas essenciais e outras modificações bioquímicas relevantes das bactérias. O ensaio fornece uma medida da resposta subletal, geralmente expressa na concentração que causa 50 % da redução da luz após a exposição por um tempo de 15 minutos (CE(I)₅₀) (Parvez *et al.*, 2006).

Os organismos *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia dubia* são microcrustáceos pertencentes à Classe Cladocera, Família Daphnidae. Encontrados em ambientes dulcícolas e rios e fazem parte do zooplâncton, sendo importante na cadeia alimentar. Representam uma ligação entre os produtores primários e os consumidores secundários ao se alimentarem de algas e servirem de alimento para peixes e outros invertebrados. Alterações na população e no comportamento desses organismos podem interferir em outros níveis tróficos do ecossistema aquático. A sua importância ecológica constitui um dos fatores pelos quais são utilizados em ensaios de toxicidade, além de serem organismos facilmente cultiváveis em laboratório e apresentarem sensibilidade a diversas classes de compostos químicos (Zagatto e Bertoletti, 2006).

A maioria das espécies pertencentes à família Daphnidea são filtradores, suas pernas torácicas, compostas por cerdas, agem como peneiras que retêm algas, bactérias e pequenas partículas de matéria orgânica da água. O alimento é transferido para boca, onde é moído pelas mandíbulas e direcionado para o trato digestivo. Essa é uma característica fundamental para a interação com agentes tóxicos quando presentes na água (Zagatto e Bertoletti, 2006).

O gênero *Biomphalaria* pertence ao filo Mollusca, classe Gastropoda, subclasse Pulmonata, ordem Basommatophora, família Planorbidae, (Barnes, 1990). É um caramujo de água doce que vive nas regiões tropicais, América do Sul e América Central, (Baker, 1945).

Esses caramujos são considerados bons bioindicadores para estudos de biomonitoramento por apresentar ampla distribuição geográfica no Brasil, apresentar baixa dispersão, serem facilmente coletados e o seu manejo ser simples. São hermafroditas e possuem um ciclo de vida relativamente curto, podendo se reproduzir durante o ano todo sob condições controladas (pH, temperatura, oxigênio, alimentação) (Munzinger, 1987; Carvalho, 1992).

Nakano *et al.*, 2003, estabeleceram o teste do letal dominante em *Biomphalaria glabrata* utilizando dois agentes mutagênicos de referência: ciclofosfamida e mitomicina C. Os dois

agentes induziram mutações em células germinativas em todas as concentrações usadas. Como a ciclofosfamida precisa ser metabolizada para causar danos genotóxicos, os resultados desse ensaio mostraram que *B. glabrata* pode absorver e ativar mutagênicos químicos presentes no ambiente aquático.

Outros agentes mutagênicos também já foram estudados, como a radiação gama, que induziu mutações em células germinativas de *Biomphalaria glabrata* (Tallarico *et. al.*, 2004). Ao contrário da ciclofosfamida e da mitomicina C, a radiação gama afetou as células germinativas em todos os estágios de desenvolvimento.

O teste do Cometa foi adaptado ao organismo *Biomphalaria glabrata*. Para realização do teste são utilizados os hemócitos, células sanguíneas encontradas em todas as partes do corpo do animal. A hemolinfa contém os hemócitos e é o tecido mais apropriado para o biomonitoramento. Esse fluido tem um importante papel fisiológico no transporte de materiais tóxicos e no mecanismo de defesa, o que significa que está diretamente exposto aos contaminantes (Villela *et. al.*, 2006). Os efeitos genotóxicos da radiação gama já foram detectados no teste do cometa em *Biomphalaria glabrata* (Grazeffe *et. al.*, 2008).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Para os estudos realizados no presente trabalho utilizou-se os corantes Remazol Preto B 133% e Remazol Alaranjado 3R 133%, que foram cedidos pela empresa DyStar do Brasil. Foram realizados ensaios de toxicidade aguda e crônica, genotoxicidade e a avaliação da eficácia no emprego da radiação com feixe de elétrons para a redução da cor e toxicidade dos corantes. Além disso, foi realizado um estudo da toxicidade aguda e crônica dos corantes após modificação química estrutural.

Os experimentos foram realizados em colaboração entre o Laboratório de Ensaios Biológicos Ambientais do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares e o Laboratório de Parasitologia e Malacologia do Instituto Butantan.

Na FIGURA 7 é apresentado um resumo da metodologia aplicada sob a forma de fluxograma.

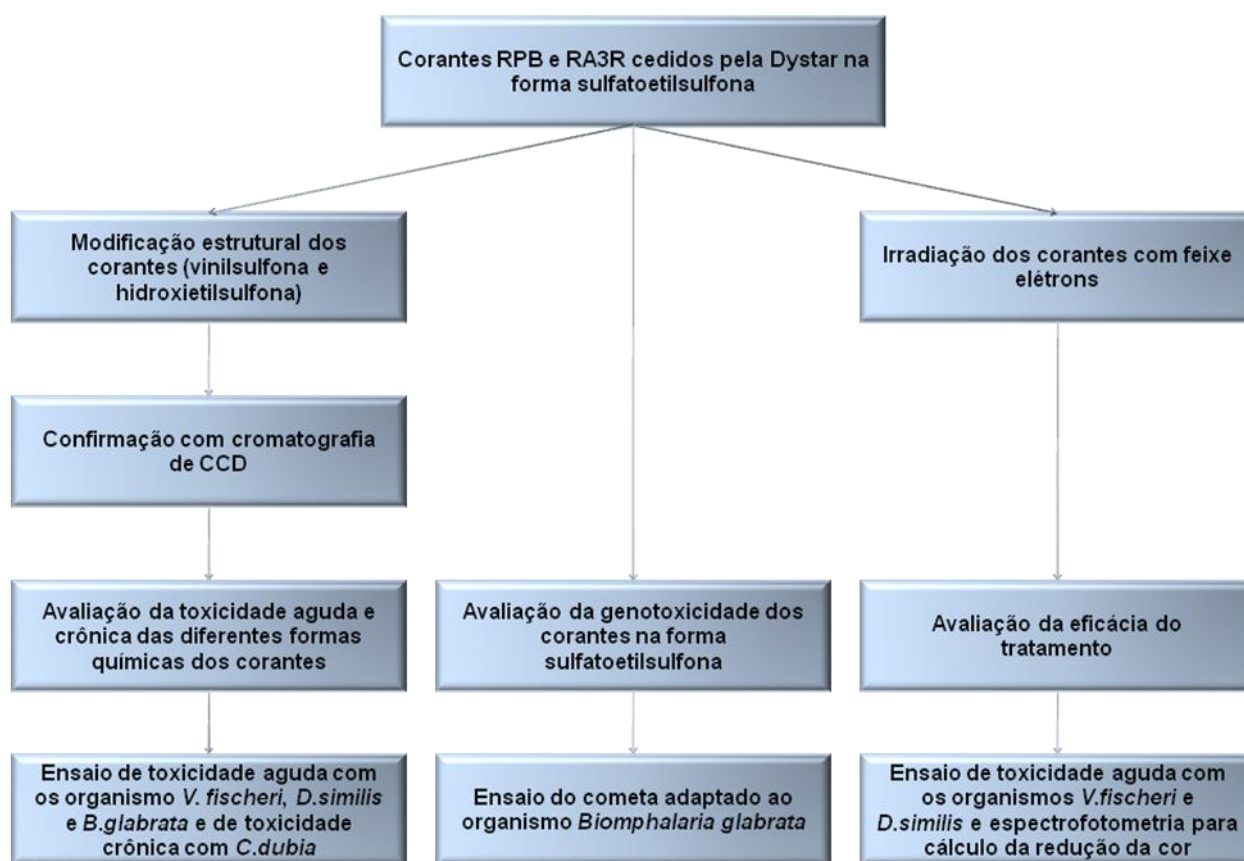


FIGURA 7. Fluxograma da metodologia

4.1. Preparo dos Corantes – Sulfatoetilsulfona

Os corantes Remazol Preto B 133% e Remazol Alaranjado 3R 133% foram cedidos na forma sulfatoetilsulfona e foram utilizados nos ensaios sem purificação prévia. Para cada corante foi preparada uma solução concentrada (15 g L^{-1}) em água destilada.

A partir da solução concentrada foi realizada a modificação na estrutura química dos corantes e em seguida uma diluição com água de cultivo de cada organismo para a execução dos ensaios biológicos.

Nos experimentos com a irradiação com feixe de elétrons a solução de cada corante foi diluída para 200 mg L^{-1} .

4.2. Preparo dos Corantes – Vinilsulfona

A partir da solução concentrada (15 g L^{-1}) dos corantes na forma sulfatoetilsulfona, o pH foi ajustado para 11-12 adicionando-se NaOH 40%. As soluções foram aquecidas a 40-45 °C por 30 minutos e, em seguida, a reação foi interrompida ajustando-se o pH para 4,5-5,0 com HCl 31%. A modificação química do RPB para vinilsulfona está representada na FIGURA 11.

4.3. Preparo dos Corantes – Hidroxietilsulfona

A partir da solução concentrada (15 g L^{-1}) dos corantes na forma sulfatoetilsulfona, o pH foi ajustado para 11-12 adicionando-se NaOH 40%. As soluções foram aquecidas a 70-80 °C por 90 minutos e, em seguida, a reação foi interrompida ajustando-se o pH para 4,5-5,0 com HCl 31%. A modificação química do RPB para hidroxietilsulfona está representada na FIGURA 8.

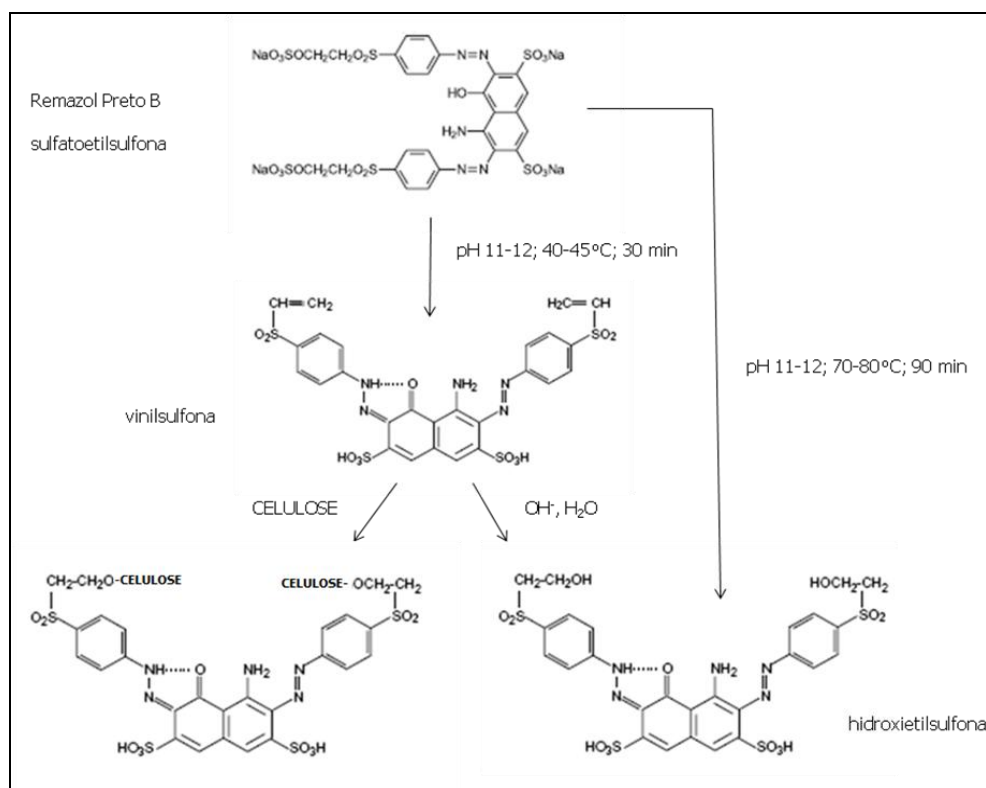


FIGURA 8. Modificação estrutural do corante Remazol Preto B 133% (vinilsulfona e hidroxietilsulfona)

4.4. Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Após modificação estrutural dos corantes, foi realizada cromatografia em camada delgada. A placa cromatográfica de alumínio revestida com RP18 F 254 (Merck) foi utilizada como fase estacionária e uma solução de metanol (45%), solução tampão pH 7 (20%) e NaCl 5% (35%) como fase móvel. Para análise, 5 μL dos corantes (2 g L^{-1}) foram aplicados na placa. O tempo de desenvolvimento do cromatograma foi de aproximadamente 80 minutos.

4.5. Ensaio de Toxicidade Aguda com *Vibrio fischeri*

4.5.1. Determinação da Concentração Efetiva Mediana CE(I)₅₀

Os ensaios de toxicidade aguda com a bactéria marinha luminescente *Vibrio fischeri* (FIGURA 9) foram realizados utilizando-se o sistema Microtox (Microbics Corporation), de acordo com a norma da ABNT NBR 15411-3 (2006).

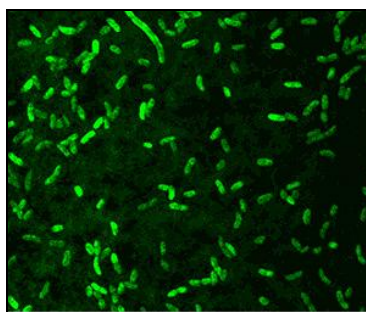


FIGURA 9. Bactéria marinha *Vibrio fischeri*

Fonte: http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Vibrio_fischeri

As bactérias foram obtidas da UMWELT Ltda e armazenadas em freezer a -20 °C. Para a realização do ensaio, as bactérias foram reconstituídas com 350 µL do reagente específico do sistema BIOLUX. Em seguida, foi realizada uma diluição (1:10) utilizando-se o mesmo reagente e a solução bacteriana final foi condicionada a 3 °C. Após estabilização por 15 minutos, 100 µL da solução bacteriana final foram transferidos para cubetas atóxicas específicas, armazenadas a 15 °C e, de imediato, realizado a primeira leitura da luminescência (I_0) utilizando o fotômetro (Analyzer M-500).

Para o preparo das soluções dos corantes testados foram utilizados 13,4 µL da solução padrão (15 g L^{-1}). O volume foi aferido para 2 mL utilizando NaCl (2%) e, em seguida, 200 µL de NaCl (20%) foram adicionados para o ajuste osmótico. A partir dessa solução, foram realizadas diluições seriadas (fator 2) utilizando NaCl (2%).

As concentrações finais dos corantes Remazol Preto B (RPB) e Remazol Alaranjado 3R (R3R) em suas diferentes formas químicas utilizadas nos ensaios foram de $81,9 \text{ mg L}^{-1}$, $40,95 \text{ mg L}^{-1}$, $20,47 \text{ mg L}^{-1}$ e $10,23 \text{ mg L}^{-1}$. A solução de NaCl (2 %) foi utilizada como controle negativo.

Após o preparo das soluções dos corantes, 900 µL de cada solução foram transferidos para as cubetas contendo a bactéria. Após 15 minutos de incubação a 15 °C, uma segunda leitura da luminescência (I_{15}) foi realizada e o valor da $CE(I)_{50}$ (concentração efetiva mediana que reduz em 50 % a luminescência) foi calculado com o auxílio do programa Microtox OMNI (Versão 7.82) desenvolvido pela Microbics Corp. Devido à coloração das amostras dos corantes testados foi realizada, quando necessário, uma correção da absorbância para o cálculo final da $CE(I)_{50}$, seguindo os procedimentos descritos do fabricante.

O fenol foi a substância referência para avaliar a sensibilidade dos organismos. Os ensaios foram realizados seguindo a metodologia descrita anteriormente e os resultados obtidos foram utilizados para a elaboração de uma carta-controle de sensibilidade.

4.6. Ensaio de Toxicidade Aguda com *Daphnia similis*

O procedimento para cultivo e manutenção de *Daphnia similis* (FIGURA 10) foi realizado de acordo com a norma NBR 12713, 2004 e procedimentos internos do laboratório.



FIGURA 10. Microcrustáceo *Daphnia similis*

Fonte: Foto cedida pela Dra. Sueli Ivone Borrely

Os organismos cultivados em laboratório durante várias gerações foram mantidos em lotes de até 25 adultos/L, colocados em recipientes de vidro de 2000 mL e mantidos em incubadoras com luminosidade difusa (fotoperíodo de 16 horas de luz) e temperatura de 20 °C (± 2 °C). A alimentação diária foi realizada com $3,2 \times 10^6$ células / mL por organismo da suspensão de algas (*Pseudokirchneriella subcapitata*) e 0,2 mL de alimento composto à base de ração de peixe e levedura diluídos em água de cultivo (RL).

A água de cultivo utilizada foi proveniente da represa Paiva de Castro (Mariporã – SP), com o ajuste da dureza total para 46 mg L^{-1} de CaCO_3 e $\text{pH } 7,0 \pm 0,5$. A troca de água dos cultivos foi realizada uma vez por semana evitando diferenças de temperatura maiores que $2 \text{ }^\circ\text{C}$. Para garantir a disponibilidade contínua de organismos-teste para os ensaios foram mantidos lotes de diferentes faixas etárias, com no máximo 28 dias.

O controle da sensibilidade dos cultivos foi realizado uma vez a cada 15 dias com a substância de referência cloreto de potássio (KCl). Os ensaios foram realizados seguindo a metodologia descrita para os ensaios de toxicidade aguda com os corantes. As principais concentrações utilizadas nos ensaios foram de 0, 200, 400, 600, 800 e 1000 mg L^{-1} .

Os resultados do cálculo da CE(I)_{50} obtidos com o cloreto de potássio foram utilizados para elaborar uma carta controle, que é a representação gráfica da avaliação periódica dos resultados obtidos com uma determinada substância de referência.

4.6.1. Determinação da Concentração Efetiva Mediana CE(I)_{50}

Os ensaios de toxicidade aguda com o microcrustáceo *Daphnia similis* foram realizados de acordo com a norma NBR 12713, 2004.

As concentrações dos corantes utilizadas nos ensaios foram determinadas a partir de um ensaio preliminar. Para a realização dos ensaios definitivos com o corante Remazol Preto B foram utilizadas as concentrações de 25, 50, 75, 100, 200 e 400 mg L^{-1} . O corante nas formas vinilsulfona e hidroxietilsulfona foram utilizadas as concentrações de 6,25, 12,5, 25, 50, 75, 100 e 200 mg/L .

Os ensaios com o corante Remazol Alaranjado 3R e as diferentes formas químicas foram realizados com as concentrações 0,78, 1,56, 3,12, 6,25, 12,5, 25 e 50 mg L^{-1} , obtidas por diluição seriada. A água de cultivo foi utilizada como controle negativo.

Para cada concentração dos corantes foram adicionados 20 indivíduos jovens (entre 6 e 24 horas de vida), sendo 4 réplicas contendo 5 organismos em cada recipiente com 10 mL de solução. Os organismos foram expostos durante 48 horas, mantidos em incubadoras a $20 \text{ }^\circ\text{C} (\pm 0,5)$, sem iluminação e alimentação. Após a exposição, os organismos imóveis foram contabilizados e o valor da CE(I)_{50} (concentração efetiva mediana que causa 50 % de

imobilidade) foi calculado com o auxílio do programa Trimmed Spearman Karber com correção de Abbot.

4.7. Ensaio de Toxicidade Aguda com *Biomphalaria glabrata*

Os caramujos selvagens da espécie *Biomphalaria glabrata* (FIGURA 11) foram coletados em Barreiro de Baixo (Belo Horizonte, MG) e cultivados em laboratório durante várias gerações. Os organismos foram mantidos em aquários plásticos (medindo 50 x 23 x 17 cm) com água filtrada, aeração permanente, fotoperíodo de 16 horas de luz e temperatura de 25 °C. Em cada aquário foram colocados no máximo 50 organismos, alimentados com alface fresca *ad libitum* e ração de peixe a cada 48 h. A troca de água dos cultivos foi realizada a cada 15 dias.



FIGURA 11. Espécime adulto de *Biomphalaria glabrata*

Fonte: Foto cedida pela Dra. Lenita de Freitas Tallarico

4.7.1. Determinação da Concentração Letal Mediana CL₅₀ em Adultos

Os ensaios de toxicidade aguda utilizando o caramujo selvagem *Biomphalaria glabrata* adulto foram realizados de acordo com Kawano *et al.*, 1992, com modificação no aumento do tempo de exposição.

A seleção dos organismos adultos para a realização dos ensaios foi realizada com base no tamanho (10 a 13 mm), idade e saúde dos animais.

As concentrações dos corantes utilizadas nos ensaios definitivos foram determinadas com base em um ensaio preliminar. Para isso, 10 organismos foram expostos durante 72 h a diferentes

concentrações dos corantes, obtidas a partir de diluições da solução padrão (15 g L^{-1}) com a água de cultivo.

Para a realização dos ensaios definitivos com os corantes Remazol Preto B e Remazol Alaranjado 3R e suas diferentes formas químicas foram utilizadas as concentrações de 100, 1000, 2000 e 5000 mg L^{-1} . A água de cultivo foi utilizada como controle negativo e o dicromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) como controle positivo.

Para cada concentração dos corantes foram adicionados 30 animais adultos, sendo 3 réplicas contendo 10 organismos em cada frasco de vidro com, aproximadamente, 180 mL de solução. Os frascos foram vedados para que os organismos permanecessem em contato com os corantes. O tempo de exposição foi de 72 horas sem alimentação e, em seguida, observados por um período de 7 dias em água de cultivo.

Após a exposição, os organismos mortos foram contabilizados pela comprovação da ausência de batimentos cardíacos ou da visualização da palidez da concha (perda da hemolinfa) e a CL_{50} (concentração que causa 50 % de mortalidade) foi calculada. Para a determinação da CL_{50} foi utilizado o método dos probitos (programa PROBITCF) desenvolvido no Departamento de Biologia-Genética, Instituto de Biociências – USP.

4.8. Ensaio de Toxicidade Crônica com *Ceriodaphnia dubia*

O procedimento para cultivo e manutenção de *Ceriodaphnia dubia* (FIGURA 12) foi realizado de acordo com a norma ABNT NBR 13373 (2005) e procedimentos internos do laboratório.



FIGURA 12. Microscrustáceo *Ceriodaphnia dubia*

Fonte: Foto cedida pela Dra. Sueli Ivone Borrely

Os organismos cultivados foram mantidos em lotes de até 25 adultos/L, colocados em recipientes de vidro de 1000 mL e mantidos em incubadoras com luminosidade difusa (fotoperíodo de 16 horas de luz) e temperatura de 25 °C (± 2 °C). A alimentação diária foi realizada com 2×10^5 células / mL por organismo da suspensão de algas (*Pseudokirchneriella subcaptata*) e 0,2 mL de alimento composto, à base de ração de peixe e levedura diluídos em água de cultivo (RL).

A água de cultivo utilizada foi proveniente da represa Paiva de Castro (Mariporã – SP), com o ajuste da dureza total para 46 mg L⁻¹ de CaCO₃ e pH 7.0 \pm 0.5. A troca de água dos cultivos foi realizada uma vez por semana evitando diferenças de temperatura maiores que 2 °C. No manuseio dos organismos adultos foram utilizadas pipetas de diâmetro adequado com ponta arredondada. Para garantir a disponibilidade contínua de organismos-teste para os ensaios foram mantidos lotes de diferentes faixas etárias, com no máximo 21 dias.

O controle da sensibilidade dos cultivos foi realizado com a substância de referência cloreto de potássio (KCl). Os ensaios foram realizados seguindo a mesma metodologia descrita para os ensaios de toxicidade crônica com os corantes. As principais concentrações utilizadas nos ensaios foram de 0, 35, 70, 125, 250 e 300 mg L⁻¹. A carta-controle foi elaborada com os valores médios de Vc (valor crônico) e limites de 2 desvios-padrão.

4.8.1. Determinação da Concentração de Efeito Observado (CEO), Concentração de Efeito Não Observado (CENO) e Valor Crônico (Vc)

Soluções de 6,25, 12,5, 25, 50, 75 e 100 mg L⁻¹ de cada corante foram preparadas com água de cultivo. Para cada concentração foram adicionados 10 indivíduos jovens (entre 6 e 24 horas de vida), separadamente, em recipientes contendo 20 mL de solução. O ensaio foi realizado durante 7-8 dias com troca das soluções a cada 48 h. Para considerar o ensaio válido, a mortalidade do controle não poderia ultrapassar 20%, além de obter uma média mínima de 15 neonatos durante o experimento. A porcentagem de sobreviventes e a média de jovens produzidos por cada fêmea foram calculadas, excluindo os adultos mortos e machos.

Os resultados foram analisados estatisticamente utilizando o teste de hipóteses. Os dados foram testados quanto à normalidade e homogeneidade de variância. O Método de Dunnett foi

empregado para comparar as médias dos valores dos grupos expostos com o controle para determinar o CENO (maior concentração em que não se obtêm efeitos estatisticamente significativos em relação ao controle) e CEO (menor concentração em que são observados efeitos). O VC (estimativa pontual de uma concentração provavelmente segura) foi calculado pela média geométrica dos valores de CENO e CEO. Quando os dados não seguiram uma distribuição normal ou não encontraram a homocedasticidade, o teste Steel Many One foi empregado para determinar o CENO e CEO.

4.9. Ensaio de Genotoxicidade - Teste do Cometa adaptado a *Biomphalaria glabrata*

Os animais foram cultivados e selecionados de acordo com a metodologia descrita para os ensaios de toxicidade. Após a exposição dos animais aos corantes, o teste do cometa foi realizado conforme metodologia de Grazzeffe et al., 2008, com modificação no tempo de lise.

4.9.1. Exposição *In vivo*

Um total de 5-6 caramujos, de 4 a 6 meses de idade e diâmetro entre 10 a 13 mm, foram expostos a(o):

- ✓ Etilmetanosulfonato por 72 horas com concentrações de 1, 10 e 50 mg L⁻¹.
- ✓ Corante Remazol Preto B 133 % (sulfatoetilsulfona) por 7 dias a concentrações de 10, 100, 1000 e 2000 mg L⁻¹, determinadas de acordo com os ensaios de toxicidade aguda.
- ✓ Corante Remazol Alaranjado 3R 133 % (sulfatoetilsulfona) por 7 dias a concentrações de 10, 100, 1000 e 2000 mg L⁻¹, determinadas de acordo com os ensaios de toxicidade aguda.

4.9.2. Metodologia do Teste do Cometa

Para a realização dos ensaios do cometa, de cada animal exposto a diferentes concentrações dos corantes e do etilmetanosulfonato foram coletados 100 µL de hemolinfa através de um estímulo pedal. A viabilidade dos hemócitos presentes na hemolinfa foi verificada pelo teste de exclusão do Trypan Blue (aceitável 70-80 % de células viáveis). Em seguida, a hemolinfa foi

depositada, separadamente, em tubos para microcentrífuga (1,5 mL) e adicionados 500 µL de agarose de baixo ponto de fusão (LMP) a 0,5%. O material foi homogeneizado, o volume dividido e transferido para duas lâminas de microscopia contendo uma primeira camada de agarose a 1,5%. Com isso, para cada organismo foram preparadas duas lâminas.

As lâminas foram imersas em solução de lise (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1% Triton X-100 e 20% DMSO, pH 10.0) e mantidas por 1 a 2 horas a 4 °C, protegidas da luz.

Após a lise, as lâminas foram incubadas em tampão alcalino (300 mM NaOH e 200 mM EDTA, pH>13) por 20 minutos e, em seguida, foi realizada a eletroforese (0.74 V/cm) durante 20 minutos, utilizando o mesmo tampão alcalino. As lâminas foram retiradas e a reação neutralizada com 400 mM de Tris (pH 7.5) durante 5 minutos. O processo de neutralização foi repetido por 3 vezes e, ao final, as lâminas foram fixadas com etanol absoluto por 10 minutos.

Para a visualização dos danos, as lâminas foram previamente re-hidratadas em água destilada durante 5 minutos e coradas com 50 µl de brometo de etídio (20 µg/mL). Para cada lâmina foram analisadas 100 células em microscópio confocal da marca Zeiss, modelo Axiolab.

A análise visual dos danos foi realizada com base no trabalho de Jaloszynski *et al.*,1997 e consistiu na classificação dos cometas em categorias (0 a 3) de acordo com o dano no DNA (extensão da migração do DNA) (FIGURA 13).


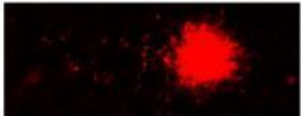
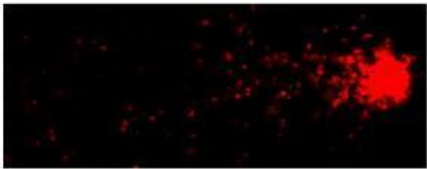
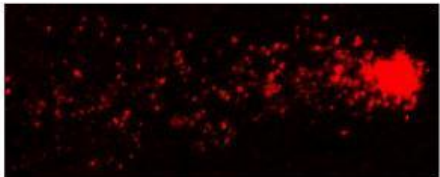
Imagem do DNA danificado	Migração do DNA	Categoria do dano
	Nenhuma	0
	Pouca	1
	Intermediária	2
	Muita	3

FIGURA 13. Classes de danos detectado em hemócito de *B. glabrata* – análise visual

Classe 0 - células sem dano: cometas com cabeça grande e sem cauda, sem migração do DNA.

Classe 1 - células pouco danificadas: cometas com cauda bem curta, com pouca migração do DNA.

Classe 2 - células danificadas: cometas com caudas longas, com migração intermediária de DNA.

Classe 3 - células muito danificadas: cometas com cabeças bem pequenas e uma cauda muito longa, com muita migração de DNA.

A análise do dano quantitativo foi realizada utilizando a fórmula descrita por Jaloszynski et al., 1997 :

$$DD = \text{SCORE}/\Sigma/100 \quad (20)$$

Onde DD é o dano quantitativo, SCORE corresponde ao somatório de todas as classes ($1.n_1+2.n_2+3.n_3$) e Σ é a soma de todas as células contadas.

Os resultados foram analisados estatisticamente por ANOVA seguido do Método de Dunnett.

4.10. Irradiação dos Corantes com Feixes de Elétrons

Para o estudo com a irradiação com feixes de elétron, as soluções dos corantes RPB e RA3R foram preparadas conforme descrito anteriormente. Os corantes (sulfatoetilsulfona) com concentração de 200 mg L^{-1} foram irradiados em recipientes de borosilicato (tipo pyrex) cobertos com filme plástico. O volume total foi de 222 mL e espessura de 4 mm para cada recipiente, garantindo a penetração dos elétrons e a distribuição da energia recebida pelas soluções. As doses de radiação foram aplicadas fixando a energia do feixe, velocidade da esteira (exposição das amostras) e a largura do feixe (varredura), variando apenas a intensidade da corrente do feixe utilizado. Na TABELA 6 é apresentado um resumo das condições de operação do acelerador de elétrons para irradiação das amostras.

TABELA 6. Condições de irradiação utilizadas no acelerador de elétrons para a irradiação dos corantes

Parâmetros	Valores estabelecidos
Espessura do material	4 mm
Energia do feixe	1,4 MeV
Dimensões do feixe	112,0 (L) x 2,5 cm
Velocidade do feixe	$6,72 \text{ m min}^{-1}$
Tempo de exposição das soluções	0,223 s

A taxa de dose também varia de acordo com a intensidade de corrente e, portanto, para cada dose aplicada haverá uma taxa de dose correspondente. As soluções foram irradiadas com as doses de 0,5 kGy, 1 kGy, 2,5 kGy, 5 kGy e 10 kGy utilizando o Acelerador Industrial de Elétrons Dynamitron Job188, modelo DC 1500/25/4, fabricado pela RDI-Radiation Dynamics INC, instalado no Centro de Tecnologia das Radiações CTR – IPEN (37,5 kW potência; 0,5 - 1,5 MeV energia feixe elétrons; 0,3 - 25 mA corrente). Na TABELA 7 estão representadas as doses aplicadas e suas respectivas taxas de dose, bem como a intensidade da corrente utilizada.

TABELA 7. Valores de dose e taxa de dose correspondente a intensidade de corrente aplicada no acelerador de elétrons

Corrente do feixe (mA)	Dose (kGy)	Taxa de dose (kGy s ⁻¹)
0,6	0,5	2,23
1,2	1,0	4,46
3,0	2,5	11,16
6,0	5,0	22,32
12,0	10,0	44,64

O grau de redução da cor foi calculado pela variação da absorvância durante a irradiação dos corantes utilizando o espectrofotômetro da marca Shimadzu, modelo UV-1800. Para a avaliação com o RPB a variação absorvância foi observada com o comprimento de onda de 597 nm e 494 nm para o R3AR. A determinação da porcentagem de descoloração foi calculada de acordo com a fórmula abaixo:

$$\text{Redução da cor (\%)} = \frac{A_o - A_i}{A_o} \times 100 \% \quad (21)$$

Onde A_o e A_i são os valores de absorvância antes e após o tratamento, respectivamente.

4.11. pH e condutividade

A variação do pH das amostras irradiadas foi determinado utilizando-se o pHmetro da Micronal, modelo B374. A condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$) das amostras irradiadas foi estudada utilizando-se o condutivímetro modelo HQ40d da marca HACH.

4.12. Carbono Orgânico Total

Para medir a variação do carbono orgânico total das amostras foi utilizado o Analisador de Carbono Orgânico Total, TOC modelo 5000 da marca Shimadzu Co.

4.13. Toxicidade Aguda dos Corantes Irrradiados

Após a irradiação das amostras foram realizados ensaios de toxicidade aguda com *Vibrio fischeri* e *Daphnia similis* para avaliar a eficácia do tratamento na redução da toxicidade aguda. Os ensaios foram realizados de acordo com a metodologia descrita acima para cada organismo-teste.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Cromatografia de Camada Delgada

Na FIGURA 14 é mostrado o perfil cromatográfico dos corantes após sofrerem a modificação em sua estrutura química. Os números 1, 2 e 3 representam o corante RPB e 4, 5 e 6 o corante RA3R, respectivamente, nas formas sulfatoetilsulfona, vinilsulfona e hidroxietilsulfona.

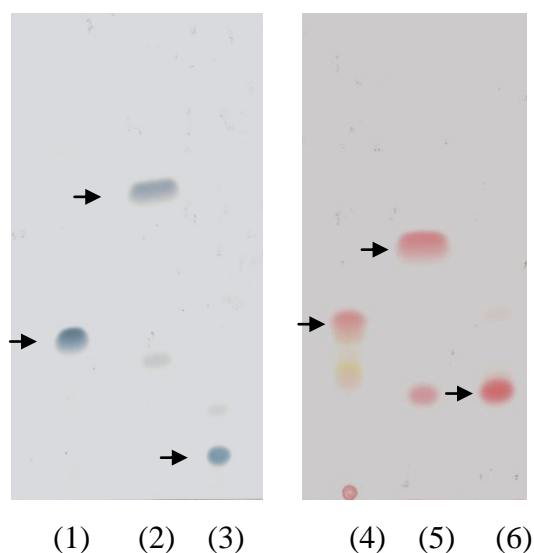


FIGURA 14 - Cromatografia do corante Remazol Preto B 133% (2 g/L); (1) hidroxietilsulfona; (2) sulfatoetilsulfona; (3) vinilsulfona; e Remazol Alaranjado 3R 133% (4) hidroxietilsulfona; (5) sulfatoetilsulfona; (6) vinilsulfona

A placa cromatográfica utilizada (RP18 F 254) tem uma cobertura apolar e, por isso, compostos apolares ficam mais tempo retidos na placa e os polares têm maior migração devido à baixa interação com a placa.

A forma química vinilsulfona (menos polar) tem maior afinidade à placa e, conseqüentemente, menor migração, a forma hidroxietilsulfona migra um pouco mais e a forma não modificada (sulfatoetilsulfona) tem a maior migração na placa. O resultado obtido foi analisado e confirmado pela indústria fabricante DyStar (comunicação pessoal).

5.2. Ensaio de Toxicidade Aguda

A seguir serão apresentados os resultados de toxicidade aguda obtidos para os organismos *V.fischeri*, *D.similis* e *B.glabrata* expostos aos corantes RPB e R3AR nas formas sulfatoetilsulfona, vinilsulfona e hidroxietilsulfona. Os valores estão expressos pela média da CE(I)₅₀ ou CL₅₀ e apresentados em mg L⁻¹. Para efeito de classificação foram considerados muito tóxicos compostos com valores de CE(I)₅₀ e CL₅₀ menores que 1 mg L⁻¹; levemente tóxicos valores entre 10 e 100 mg L⁻¹ e não tóxicos, valores maiores que 100 mg L⁻¹. A classificação foi realizada de acordo com o GHS, 2005 (*The Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals*) utilizado pela ABIQUIM (Associação Brasileira da Indústria Química) para a classificação e rotulagem de produtos químicos.

5.2.1. Ensaio com relação à Sensibilidade

Para os ensaios com *Vibrio fischeri* o fenol (C₆H₆O) foi utilizado como substância de referência e uma carta-controle foi elaborada com os resultados obtidos. O valor médio da CE(I)₅₀ foi igual a 20,3 ± 4,85 mg L⁻¹, sendo os limites da carta-controle de dois desvios-padrão (FIGURA 15).

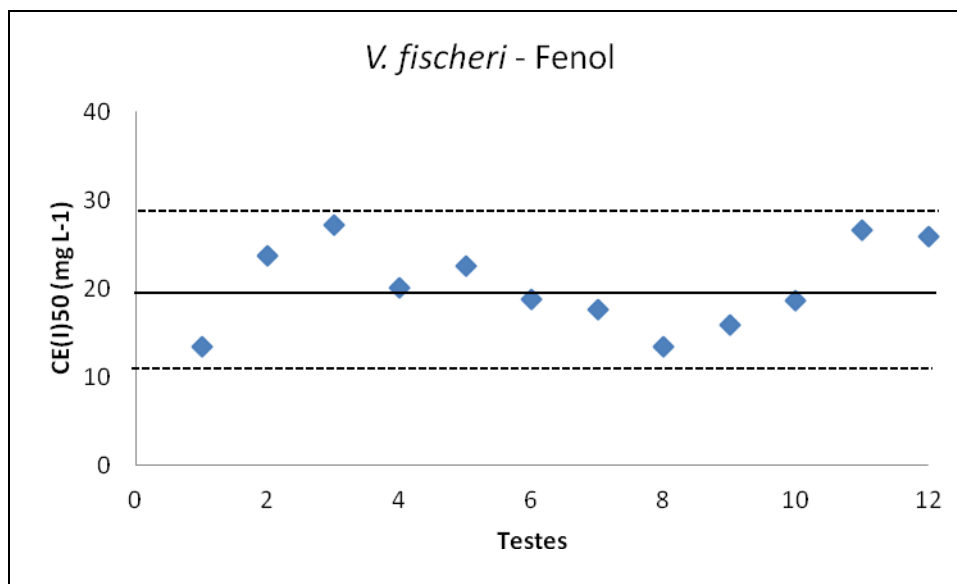


FIGURA 15. Sensibilidade do organismo *V. fischeri* ao fenol

Na FIGURA 16 é apresentada a carta-controlé elaborada a partir dos ensaios de toxicidade com cloreto de potássio, em 48 horas de exposição em *D. similis*. O valor médio da CE(I)₅₀ foi igual a $608,37 \pm 147,87 \text{ mg L}^{-1}$.

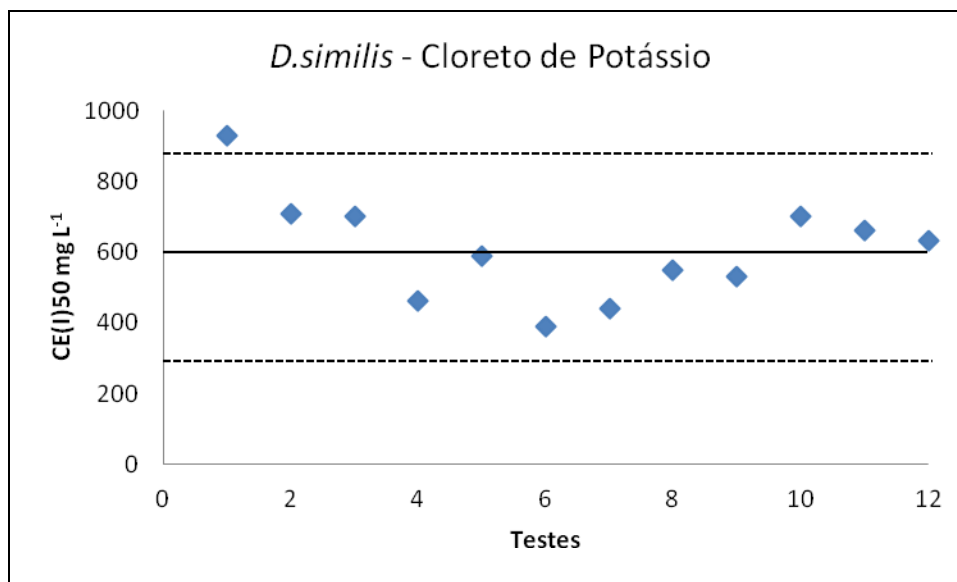


FIGURA 16. Sensibilidade do organismo *D. similis* ao cloreto de potássio

5.2.2. Avaliação da Toxicidade Aguda em *Vibrio fischeri*

Os resultados dos ensaios de toxicidade aguda realizados com a bactéria *Vibrio fischeri* são apresentados na TABELA 8 e FIGURA 17. Os valores obtidos após a exposição estão expressos pelo valor médio da CE(I)₅₀, bem como, os respectivos desvios-padrão de cada experimento realizado com os corantes nas diferentes formas químicas.

TABELA 8. Toxicidade aguda dos corantes Remazol Preto B 133% e Remazol Alaranjado 3R 133% em diferentes formas químicas ao organismo *Vibrio fischeri*

Formas Químicas	Remazol Preto B 133%	Remazol Alaranjado 3R 133%
	CE(I) ₅₀ _{15min} ; mg L ⁻¹	CE(I) ₅₀ _{15min} ; mg L ⁻¹
Sulfatoetilsulfona	27,12 ±1,43	12,72 ±0,44
Vinilsulfona	6,23 ±0,16	39,33 ±0,62
Hidroxietilsulfona	21,50 ±2,99	75,45 ±4,25

O corante RPB na forma comercial (sulfatoetilsulfona) apresentou valor médio da CE(I)₅₀ igual a 27,12 mg L⁻¹.

Após a hidrólise, foram geradas as formas químicas vinilsulfona (mais reativa com a fibra) e hidroxietilsulfona (não reage com a fibra). O corante na forma vinilsulfona apresentou valor médio da CE(I)₅₀ igual a 6,23 mg L⁻¹, aproximadamente, 4,5 vezes menor que a forma comercial sulfatoetilsulfona. Essa diferença foi analisada com o teste estatístico *t Student* e considerada significativa com um valor de $p = 0,0025$.

A forma hidroxietilsulfona do RPB apresentou valor médio de CE(I)₅₀ igual a 21,5 mg L⁻¹, menor que forma sulfatoetilsulfona; entretanto, a diferença não foi significativa estatisticamente.

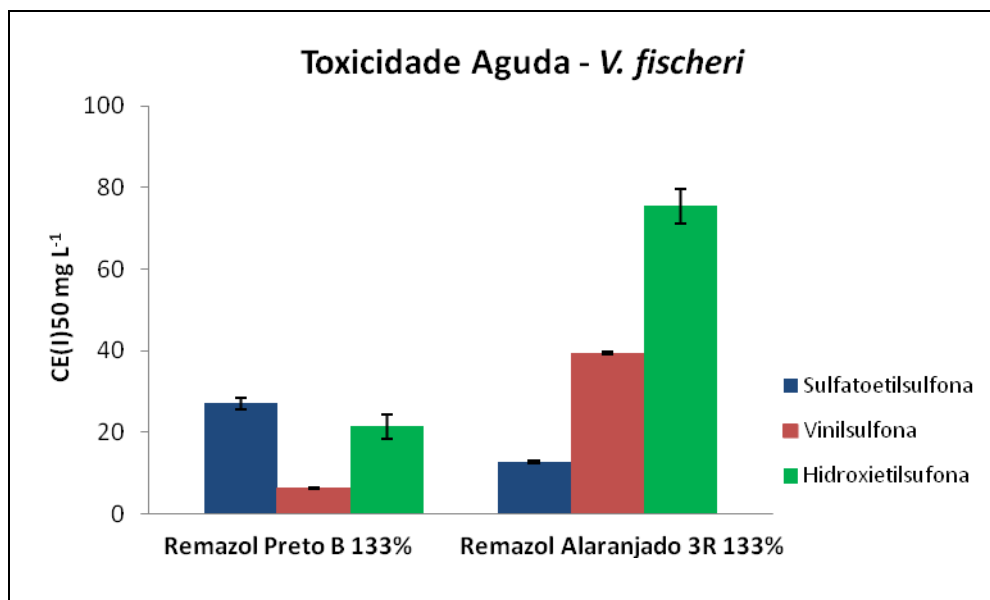


FIGURA 17. Toxicidade aguda Toxicidade aguda dos corantes Remazol Preto B 133% e Remazol Alaranjado 3R 133% em diferentes formas químicas ao organismo *Vibrio fischeri*

O corante R3AR na forma comercial sulfatoetilsulfona apresentou valor médio da $CE(I)_{50}$ igual a $12,72 \text{ mg L}^{-1}$.

Na forma vinilsulfona, a $CE(I)_{50}$ foi de $39,33 \text{ mg L}^{-1}$, cerca de 3 vezes maior que o valor obtido com a forma sulfatoetilsulfona. A diferença foi significativa com valor de $p=0,004$.

Na forma hidroxietilsulfona, o corante apresentou o maior valor médio de $CE(I)_{50}$ igual a $75,45 \text{ mg L}^{-1}$; esse valor foi 6,25 maior que a forma sulfatoetilsulfona, com valor de $p = 0,017$.

Os resultados obtidos com *Vibrio fischeri* indicam que os corantes RPB e R3AR apresentaram diferentes padrões de toxicidade. O corante RPB na forma sulfatoetilsulfona apresentou valores de $CE(I)_{50}$ maiores do que o R3AR ($p = 0,0056$). Entretanto, após a formação do vinilsulfona e hidroxietilsulfona os valores diminuíram, enquanto que com o R3AR aumentaram. Isso indica que a modificação na estrutura reativa, isoladamente, não determina a toxicidade do corante e sugere que outros componentes estruturais estão envolvidos na indução de efeitos tóxicos.

Gottlieb *et al.*, 2003, obtiveram um resultado similar para *V.fischeri* quando estudaram o corante Reativo Preto B na forma sulfatoetilsulfona ($CE(I)_{50}$ de $27,5 \text{ mg L}^{-1}$ e hidroxietilsulfona ($CE(I)_{50}$ de $11,4 \text{ mg L}^{-1}$). Porém quando outro corante têxtil Procion Navy foi hidrolisado a

toxicidade diminuiu, concluindo que não existe uma tendência comum no efeito da hidrólise dos azo corantes.

Apesar de ocorrer variações nos valores de $CE(I)_{50}$ dos corantes, apenas o corante RPB na forma vinilsulfona foi classificado como tóxico e os demais como levemente tóxicos.

5.2.3. Avaliação da Toxicidade Aguda em *Daphnia similis*

Os resultados dos ensaios de toxicidade aguda realizados com o microcrustáceo *Daphnia similis* são apresentados na TABELA 9. Os valores obtidos após a exposição estão expressos pela $CE(I)_{50}$, bem como, os valores médios e os desvios-padrão de cada experimento realizado com os corantes nas diferentes formas químicas.

TABELA 9. Toxicidade aguda dos corantes Remazol Preto B 133% e Remazol Alaranjado 3R 133% em diferentes formas químicas ao organismo *Daphnia similis*

Formas Químicas	Remazol Preto B 133%	Remazol Alaranjado 3R 133%
	$CE(I)_{50_{48h}}$; mg L ⁻¹	$CE(I)_{50_{48h}}$; mg L ⁻¹
Sulfatoetilsulfona	91,25 ±13,37	4,42 ±1,28
Vinilsulfona	475,40 ±62,12	0,54 ±0,08
Hidroxietilsulfona	406,20 ±104,93	2,82

O corante RPB apresentou valores de $CE(I)_{50}$ próximos ou acima de 100 mg L⁻¹ em todas as formas estudadas para o organismo *Daphnia similis*. Devemos destacar que após a geração das formas vinilsulfona e hidroxietilsulfona os valores de $CE(I)_{50}$ foram ainda maiores, sendo classificados como não tóxicos.

Entretanto, os valores de $CE(I)_{50}$ para o corante R3AR em todas as formas foram abaixo de 10 mg L⁻¹, em especial para a forma vinilsulfona que apresentou o menor valor médio de $CE(I)_{50}$ igual a 0,54 mg L⁻¹ e classificado como muito tóxico.

5.2.4. Avaliação da Toxicidade Aguda em *Biomphalaria glabrata*

Na TABELA 10 são apresentados os resultados de toxicidade aguda obtidos com os organismos *Biomphalaria glabrata* adulto expostos aos corantes. Os valores estão expressos em CL_{50} ($mg L^{-1}$) após exposição de 72 h.

Por se tratar de um modelo não padronizado, foi utilizado como controle positivo o dicromato de potássio. A CL_{50} foi de $61,24 mg L^{-1}$, com intervalos de confiança de 33,56 e $111,74 mg L^{-1}$.

Os corantes não apresentaram toxicidade aos moluscos em nenhuma das formas químicas estudadas. Os valores de CL_{50} foram maiores que $5000 mg L^{-1}$, com exceção para o RPB na forma vinilsulfona que apresentou CL_{50} igual a $1530 mg L^{-1}$ (1434,75-1721,36).

TABELA 10. Toxicidade aguda dos corantes Remazol Preto B 133% e Remazol Alaranjado 3R 133% em diferentes formas químicas ao organismo *Biomphalaria glabrata*

Formas Químicas	Remazol Preto B 133% $CL_{50_{72h}}$; $mg L^{-1}$	Remazol Alaranjado 3R 133% $CL_{50_{72h}}$; $mg L^{-1}$
Sulfatoetilsulfona	> 5000	> 5000
Vinilsulfona	1530 (1434,75-1721,36)	> 5000
Hidroxietilsulfona	> 5000	> 5000

Nas TABELAS 11 e 12 é apresentado um resumo de todos os resultados de toxicidade aguda obtidos para os organismos estudados expostos as diferentes formas químicas dos corantes RPB e R3AR.

TABELA 11 - Toxicidade aguda do corante Remazol Preto B 133% nas diferentes formas químicas para *V.fischeri*, *D.similis* e *B.glabrata*

Remazol Preto B 133%				
Formas Químicas	<i>V. fischeri</i> CE(I)50 _{15min} ; mg L ⁻¹	<i>D. similis</i> CE(I)50 _{48h} ; mg L ⁻¹	<i>B. glabrata</i> CL50 _{72h} ; mg L ⁻¹	Classificação
Sulfatoetilsulfona	27,12 ±1,43	91,25 ±13,37	> 5000	LT – LT – NT
Vinilsulfona	6,23 ±0,16	475,40 ±62,12	1530	T – NT – NT
Hidroxietilsulfona	21,50 ±2,99	462,2 ±104,93	> 5000	LT – NT – NT

MT = muito tóxico (CE(I)50/CL50 ≤ 1 mg L⁻¹); T = tóxico (1mg L⁻¹ < CE(I)50/CL50 ≤ 10 mg L⁻¹); LT = levemente tóxico (10 mg L⁻¹ < CE(I)50/CL50 ≤ 100 mg L⁻¹) e NT = não tóxica (CE(I)50/CL50 > 100 mg L⁻¹)

TABELA 12- Toxicidade aguda do corante Remazol Alaranjado 3R 133% nas diferentes formas químicas para *V.fischeri*, *D.similis* e *B.glabrata*

Remazol Alaranjado 3R 133%				
Formas Químicas	<i>V. fischeri</i> CE(I)50 _{15min} ; mg L ⁻¹	<i>D. similis</i> CE(I)50 _{48h} ; mg L ⁻¹	<i>B. glabrata</i> CL50 _{72h} ; mg L ⁻¹	Classificação
Sulfatoetilsulfona	12,72 ±0,44	4,42 ±1,28	> 5000	LT – T – NT
Vinilsulfona	39,33 ±0,62	0,54 ±0,08	> 5000	LT – MT – NT
Hidroxietilsulfona	75,45 ±4,25	2,82	> 5000	LT – T – NT

MT = muito tóxico (CE(I)50/CL50 ≤ 1 mg L⁻¹); T = tóxico (1mg L⁻¹ < CE(I)50/CL50 ≤ 10 mg L⁻¹); LT = levemente tóxico (10 mg L⁻¹ < CE(I)50/CL50 ≤ 100 mg L⁻¹) e NT = não tóxica (CE(I)50/CL50 > 100 mg L⁻¹)

De uma forma geral, o organismo *V.fischeri* foi o mais sensível às diferentes formas do corante RPB, sendo a forma vinilsulfona a que apresentou menor valor de CE(I)₅₀, sendo classificada como tóxica. Com relação ao R3AR, o organismo mais sensível foi a *Daphnia similis*, com baixos valores de CE(I)₅₀ para as três formas do corante, com destaque para a forma vinilsulfona classificada como muito tóxica.

A alta variabilidade na resposta dos diferentes organismos indicadores reforça a importância da utilização de mais de uma espécie, pertencentes a níveis tróficos distintos, para a avaliação da toxicidade aguda de um composto.

Os menores valores de $CE(I)_{50}$ observados foram para a forma vinilsulfona. Essa forma tem uma meia-vida longa no ambiente aquático devido à sua baixa biodegradabilidade, e pode se ligar ao sedimento ou ficar disponível na coluna d'água (Weber *et al.*, 1990). Devido a essas características, ao fato de que a concentração dos corantes nos ecossistemas aquáticos pode variar de $ng L^{-1}$ a $\mu g L^{-1}$ (Carneiro *et al.*, 2010) e com base nos resultados encontrados nesse trabalho para toxicidade aguda, podemos sugerir que os corantes estudados na forma vinilsulfona apresentam um maior risco à biota aquática que as demais formas.

5.3. Avaliação da Toxicidade Crônica em *Ceriodaphnia dubia*

A sensibilidade do organismo *C. dubia* foi realizado com cloreto de potássio, em um período de 7-8 dias de exposição. O valor crônico (Vc) foi determinado e utilizado para elaborar a carta-coontrole, onde os limites de aceitação eram de dois desvios-padrão. O valor médio dos Vc obtidos nos experimentos foi de $49,1 \pm 22,59 mg L^{-1}$ (FIGURA 18).

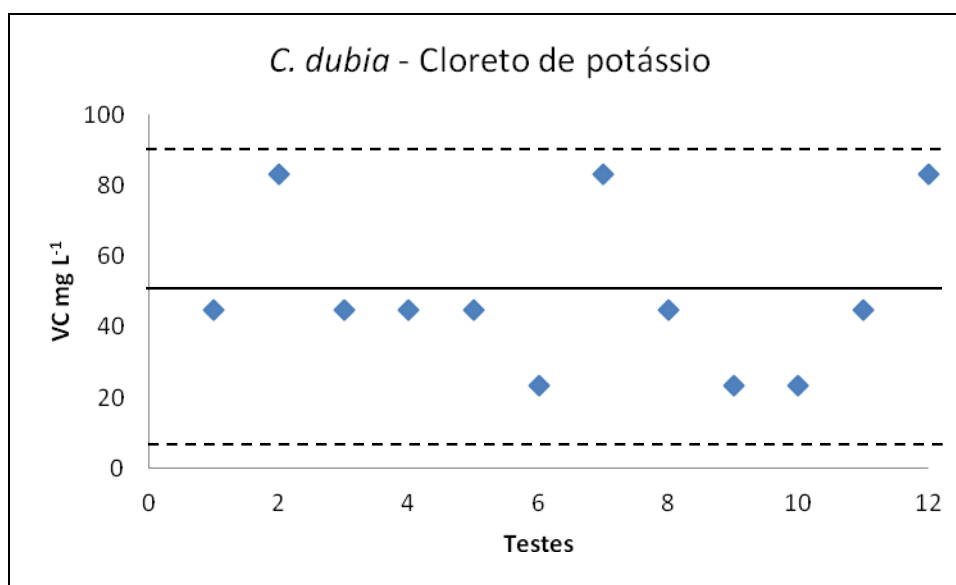


FIGURA 18. Sensibilidade do organismo *C. dubia* ao cloreto de potássio

Na TABELA 13 são representados os valores CENO e CEO obtidos nos ensaios de toxicidade crônica do corante RPB na sua forma original e após hidrólise. A média dos neonatos está representada graficamente nas FIGURAS 19, 20 e 21.

Os valores de CENO e CEO foram obtidos experimentalmente e o de VC foi calculado pela média geométrica entre os valores de CENO e CEO.

O corante RPB na forma sulfatoetilsulfona apresentou o menor valor de CENO (12,5 mg L⁻¹). Após a modificação estrutural a partir da qual foram geradas as formas vinilsulfona e hidroxietilsulfona, o corante apresentou-se menos tóxico (TABELA 13).

TABELA 13. Toxicidade crônica do corante Remazol Preto B 133% nas diferentes formas químicas

Formas Químicas	<i>Ceriodaphnia dubia</i>		
	CENO (mg L ⁻¹)	CEO (mg L ⁻¹)	VC (mg L ⁻¹)
Sulfatoetilsulfona	12,5	25,0	17,68
Vinilsulfona	25,0	50,0	35,36
Hidroxietilsulfona	75,0	100,0	86,60

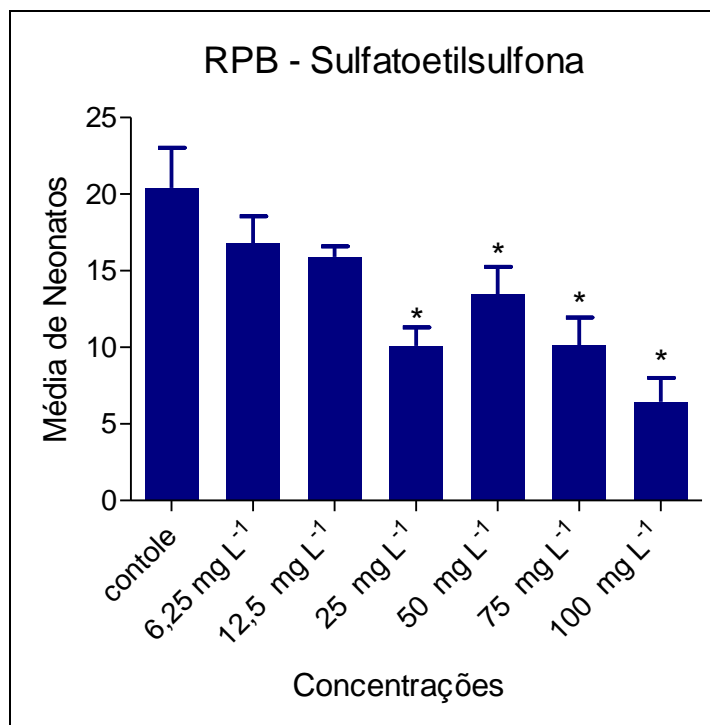


FIGURA 19. Reprodução de *C. dubia* exposta ao corante Remazol Preto B 133% na forma sulfatoetilsulfona

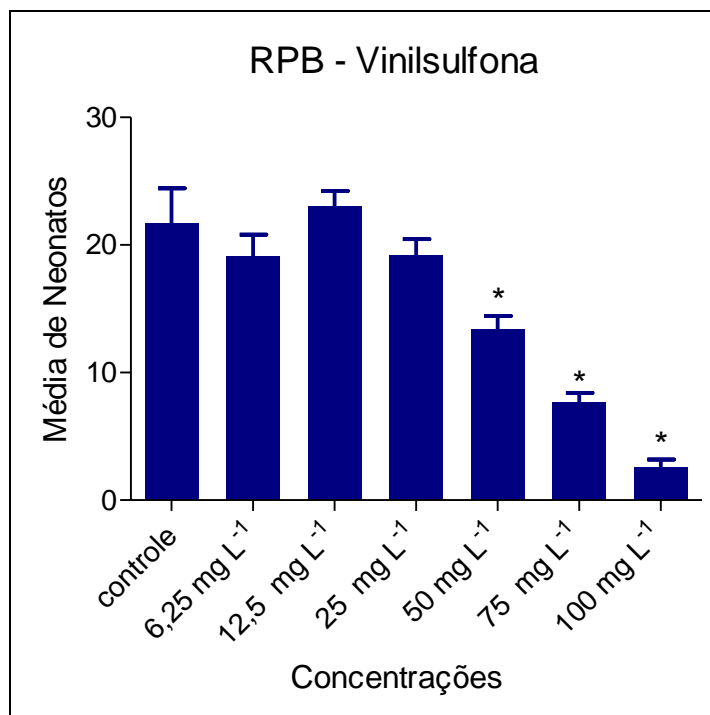


FIGURA 20. Reprodução de *C. dubia* exposta ao corante Remazol Preto B 133% na forma vinilsulfona

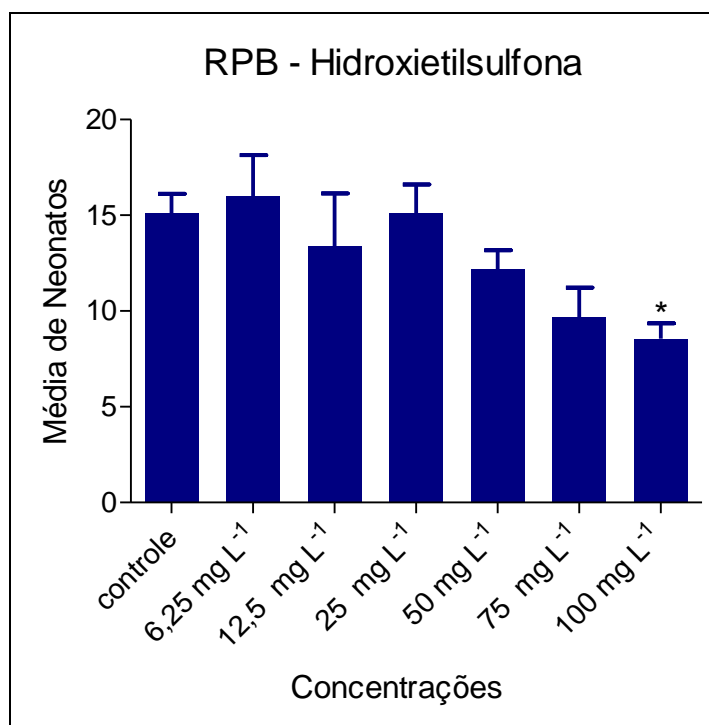


FIGURA 21. Reprodução de *C. dubia* exposta ao corante Remazol Preto B 133% na forma hidroxietilsulfona

Para o organismo *C.dubia*, nenhuma das formas químicas do corante RA3R apresentou toxicidade crônica; não foi observada nenhuma redução significativa na reprodução dos organismos testados e também nenhum efeito agudo (TABELA 14). A média dos neonatos está representada graficamente nas FIGURAS 22, 23 e 24.

TABELA 14. Toxicidade crônica do corante Remazol Alaranjado 3R 133% nas diferentes formas químicas

Formas Químicas	<i>Ceriodaphnia dubia</i>		
	CENO (mg L ⁻¹)	CEO (mg L ⁻¹)	VC (mg L ⁻¹)
Sulfatoetilsulfona	100	> 100	ND
Vinilsulfona	100	> 100	ND
Hidroxietilsulfona	100	> 100	ND

ND= não determinado

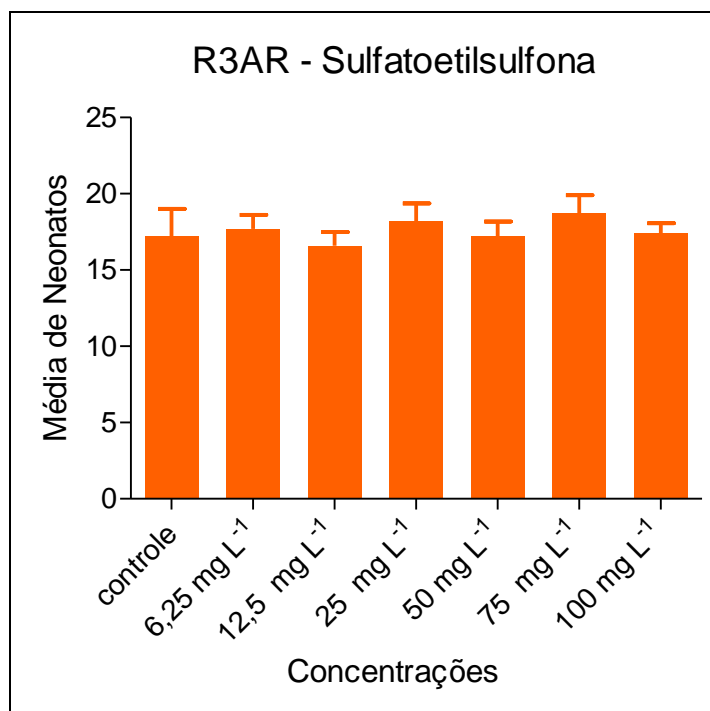


FIGURA 22. Reprodução de *C. dubia* exposta ao corante Remazol Alaranjado 3R 133% na forma sulfatoetilsulfona

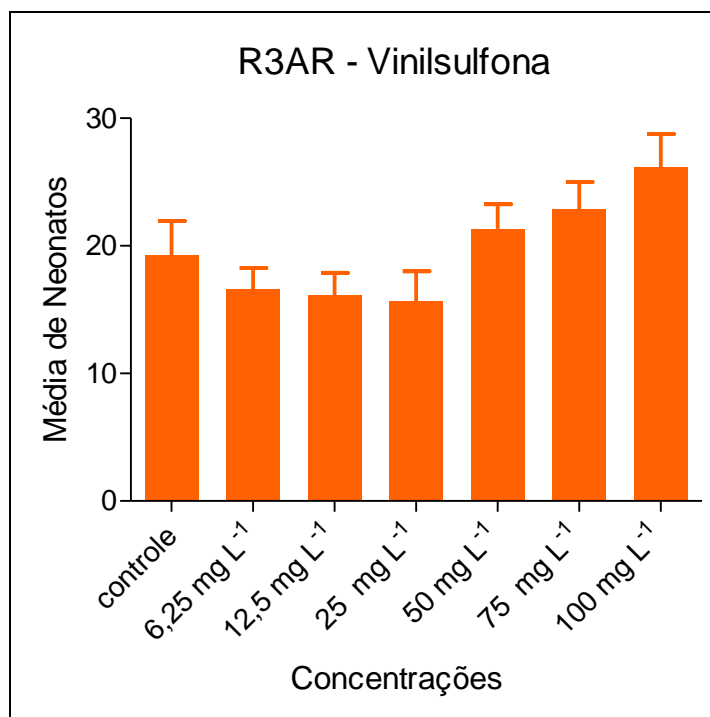


FIGURA 23. Reprodução de *C. dubia* exposta ao corante Remazol Alaranjado 3R 133% na forma vinilsulfona

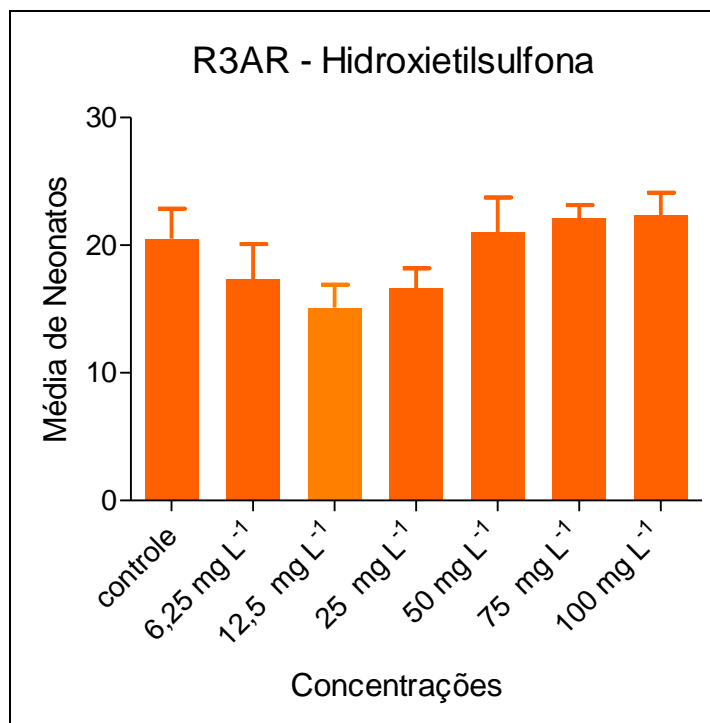


FIGURA 24. Reprodução de *C. dubia* exposta ao corante Remazol Alaranjado 3R 133% na forma hidroxietilsulfona

Os resultados obtidos com exposição crônica de *C. dubia* ao RPB nas diferentes formas estão, qualitativamente, correspondentes ao resultado esperado para *D. similis*. O CEO pode ser calculado com base no ensaio agudo ($CEO = CE(I)50/10$). Entretanto, o mesmo não foi observado para o corante R3AR, indicando que mesmo organismos próximos, podem apresentar sensibilidades diferentes a um mesmo composto. Essa diferença, de um modo geral, está relacionada ao tamanho. Organismos menores tendem a ser mais sensíveis, porém, para alguns compostos essa regra não é válida (Lopes *et al.*, 2009)

Uma hipótese para a variação qualitativa da toxicidade dos corantes aos organismos estudados pode ser a presença de impurezas, uma vez que os corantes testados foram obtidos diretamente da indústria e utilizado sem purificação. Segundo Brown e DeVito, 1993, as impurezas, como por exemplo, aminas aromáticas, benzidina e o-toluidina podem ser introduzidas durante o processo de síntese do corante ou durante a estocagem. Além disso, o posicionamento dos grupos substituintes, como os grupos sulfônicos pode influenciar diretamente na toxicidade dos corantes. Gottlieb *et al.*, 2003, observaram que a toxicidade de compostos naftol variou de acordo com o tipo e posição de seus grupos de substituição. Ácido

naftalênico foi menos tóxico quando o grupo sulfônico estava na posição 1' do que na posição 2'.

5.4. Avaliação da Genotoxicidade dos Corantes

A genotoxicidade dos corantes na forma sulfatoetilsulfona foi avaliada por meio do teste do Cometa adaptado ao organismo *Biomphalaria glabrata*. O agente alquilante direto etilmetanosulfonato (EMS) foi utilizado como controle positivo (TABELA 15 e FIGURA 25). Os resultados da análise visual do teste do Cometa em caramujos expostos aos corantes RPB e R3AR estão expressos nas TABELAS 16 e 17 e FIGURAS 26 e 27, respectivamente. Os valores estão expressos em porcentagem para cada classe de dano e o dano quantitativo (DD) foi calculado e representado graficamente.

TABELA 15. Teste do cometa em hemócitos de caramujos adultos *Biomphalaria glabrata* expostos ao etilmetanosulfonato

Concentração (mg L ⁻¹)	Nº de células	Categoria de dano no DNA (%)				DD
		0	1	2	3	
0	1200	715 (59,7)	287 (23,9)	99 (8,2)	99 (8,2)	65
1	1200	566 (47,2)	315 (26,2)	125 (10,4)	194 (16,2)	96
10	1100	375 (34,1)	325 (29,5)	163 (14,8)	237 (21,6)	124
50	1200	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1200 (100)	300

(DD – dano quantitativo; n=6)

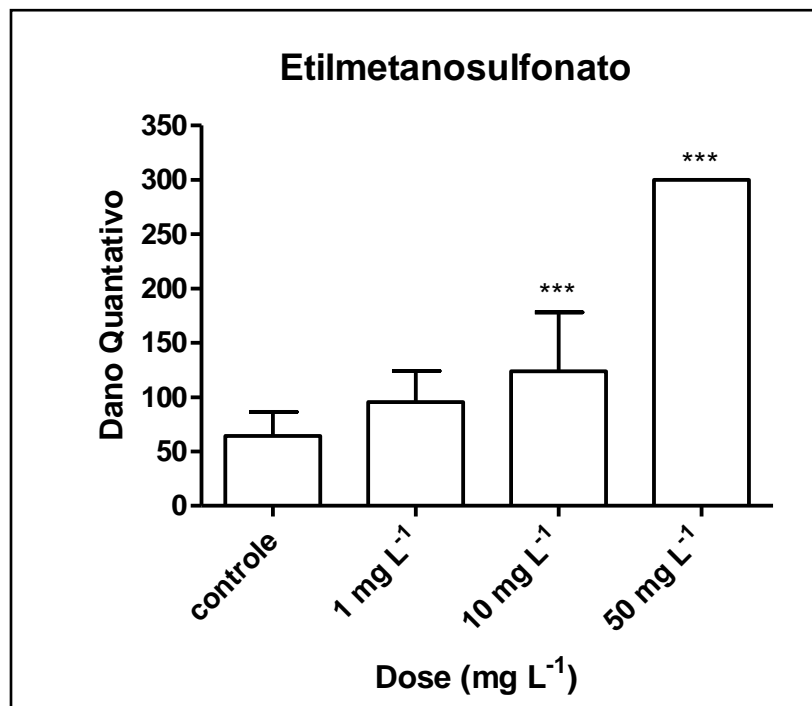


FIGURA 25. Expressão do Dano Quantativo no DNA após a exposição às concentrações de 1, 10 e 50 mg L⁻¹ de etilmetanosulfonato

O etilmetanosulfonato é um agente alquilante de ação direta. Seu potencial genotóxico já foi observado em mexilhões da espécie *Unio pictorum*, utilizando o teste do cometa (Stambuk *et al.*, 2008), e em vírus, bactérias, fungos, insetos, plantas e células de mamíferos (Sega, 1984). Sua reatividade biológica é devida ao seu grupo etil, que pode ser transferido a sítios nucleofílicos do DNA via mecanismo SN1 (substituição nucleofílica unimolecular) ou SN2 (substituição nucleofílica bimolecular) (Sega, 1984).

Os resultados obtidos demonstraram que o teste foi sensível ao EMS, com a dose de 10 mg L⁻¹ foi possível visualizar dano significativo ao DNA, com o DD igual a 124. Com a dose de 50 mg L⁻¹ o DD foi de 300, indicando que todos os cometas analisados foram classificados na classe 3, o dano máximo. Para a avaliação da citotoxicidade foi realizado o teste de exclusão do corante azul de tripan. Em todas as concentrações estudadas a viabilidade foi maior que 90 %.

TABELA 16. Teste do cometa em caramujos adultos *Biomphalaria glabrata* expostos ao corante Remazol Preto B 133% - sulfatoetilsulfona (DD – dano quantitativo; n=6)

Concentração (mg L ⁻¹)	Nº de células	Categoria de dano no DNA (%)				DD
		0	1	2	3	
0	1200	649 (54,1)	257 (21,4)	106 (8,8)	188 (15,7)	86
100	1200	666 (55,5)	264 (22)	108 (9)	162 (13,5)	81
500	1200	580 (48,3)	255 (21,3)	106 (8,8)	259 (21,6)	104
1000	1100	424 (38,6)	294 (26,7)	150 (13,6)	232 (21,1)	117
2000	1000	429 (42,9)	242 (24,2)	111 (11,1)	218 (21,8)	112

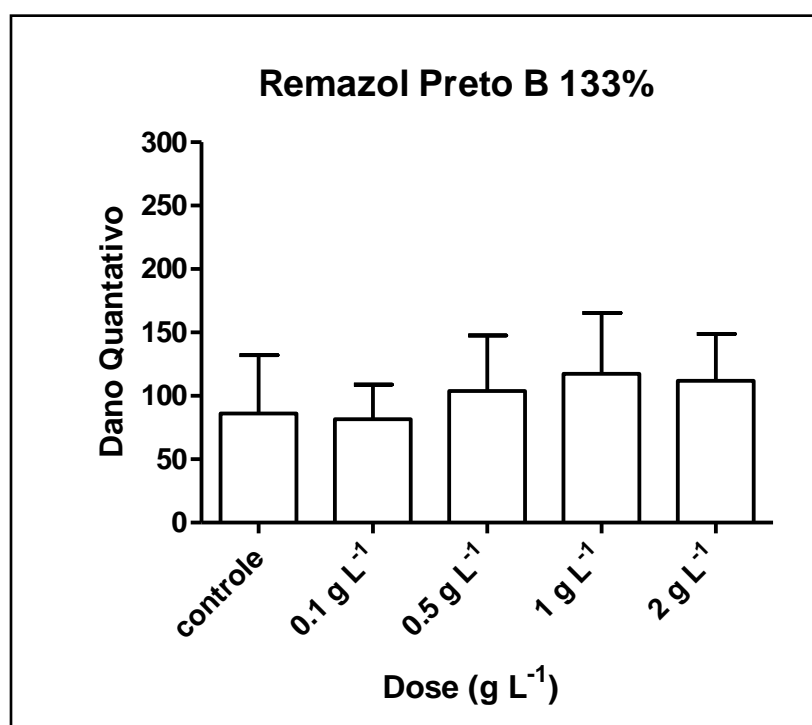


FIGURA 26. Expressão do Dano Quantitativo no DNA após a exposição às concentrações de 100, 500, 1000 e 2000 mg L⁻¹ ao corante Remazol Preto B 133% (sulfatoetilsulfona).

TABELA 17. Teste do cometa em caramujos adultos *Biomphalaria glabrata* expostos ao corante Remazol Alaranjado 3R 133% - sulfatoetilsulfona - (DD – dano quantitativo; n=6)

Concentração (mg L ⁻¹)	Nº de células	Categoria de dano no DNA (%)				DD
		0	1	2	3	
0	1200	713 (59,4)	266 (22,2)	122 (10,2)	99 (8,2)	67
100	1200	701 (58,4)	270 (22,5)	138 (11,5)	91 (7,6)	68
500	1200	738 (61,5)	185 (15,4)	130 (10,8)	147 (12,3)	74
1000	1200	719 (59,9)	247 (20,6)	102 (8,5)	132 (11)	71
2000	1200	659 (54,9)	240 (20)	120 (10)	181 (15,1)	85

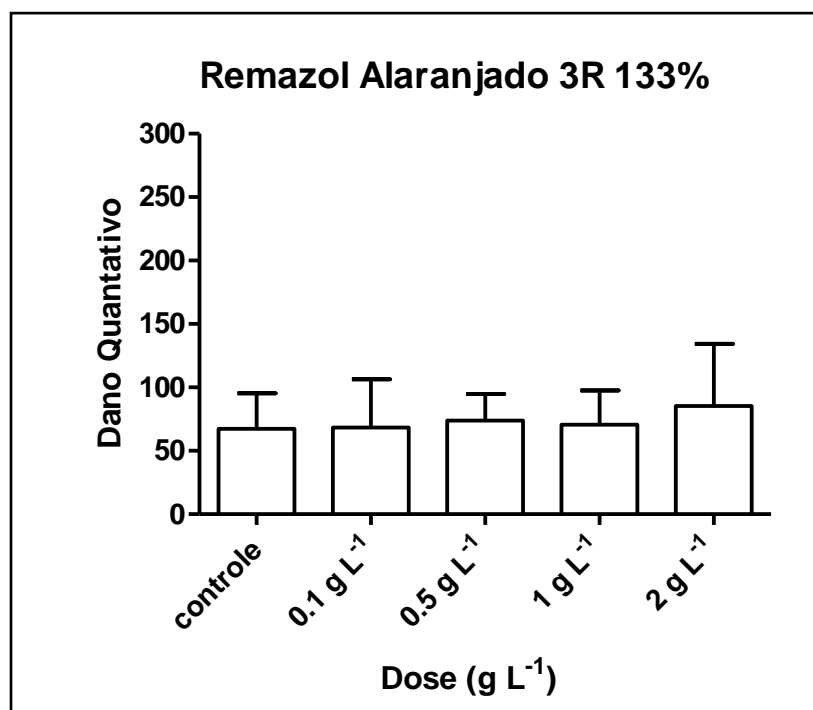


FIGURA 27. Expressão do Dano Quantitativo no DNA após a exposição às concentrações de 100, 500, 1000 e 2000 mg L⁻¹ ao corante Remazol Alaranjado 3R 133% (sulfatoetilsulfona).

O corante RPB (TABELA 16 e FIGURA 26) apresentou genotoxicidade nas concentrações mais elevadas. Foi observada uma diferença significativa entre os valores de dano quantitativo do controle (DD=86) e nas concentrações 500 mg L⁻¹ (DD=104), 1000 mg L⁻¹ (DD=117) e 2000 mg L⁻¹ (DD=112).

O resultado foi corroborado com Malachová *et al.*, 2006, onde o corante Reativo Preto 5 foi positivo para as cepas de *Salmonella* YG1041 e YG1042 apenas com ativação metabólica.

Entretanto, deve ser observado que o dano ocorreu em elevadas concentrações e que a maior porcentagem de dano está na classe 0 e na classe 1, onde a soma é maior que 50 % do dano total. Indicando que o corante tem uma ação genotóxica fraca.

Novatny *et al.*, 2006 avaliaram a mutagenicidade de dois corantes azo e dois antraquinona no teste de mutação reversa com *Salmonella* (teste de Ames). O corante azo reativo Reativo Laranja 16 foi o único positivo na presença e ausência de ativação metabólica, indicando mutação de substituição de base e “frameshift”. O corante Disperso Azul 3 induziu mutações “frameshift” após a ativação metabólica. As respostas positivas das cepas de *Salmonella* YG1041 e YG1042 foram atribuídas à possível presença de grupos metil e hidroxil etil na posição *para* (β). O resultado negativo dos corantes azo Vermelho do Congo e antraquinona reativo Remazol Azul Brilhante R foi atribuído à presença de grupos sulfônicos na molécula que podem diminuir o efeito mutagênico.

O estudo realizado por Malachová *et al.*, 2006 com o teste de Ames corroborou os resultados obtidos por Novatný *et al.*, 2006 com os corantes Reativo Laranja 16, Azul Disperso 3 e Vermelho do Congo. Os resultados obtidos nos estudos com o teste de Ames indicaram o potencial mutagênico do corante, porém, não foi observado nenhum efeito genotóxico do R3AR (TABELA 17 e FIGURA 27) com o teste do Cometa em hemócito de *B.glabrata*.

5.5. Irradiação com Feixe de Elétrons

Nas FIGURAS 28 e 29 estão representados os espectros UV/Vis dos corantes RA3R e RPB (sulfatoetilsulfona) na concentração de 200 mg L⁻¹ após a irradiação com feixe de elétrons. O espectro é similar para os dois corantes, apresentando uma forte absorbância na região do visível (400 - 800 nm) e na região do UV (100 - 400 nm).

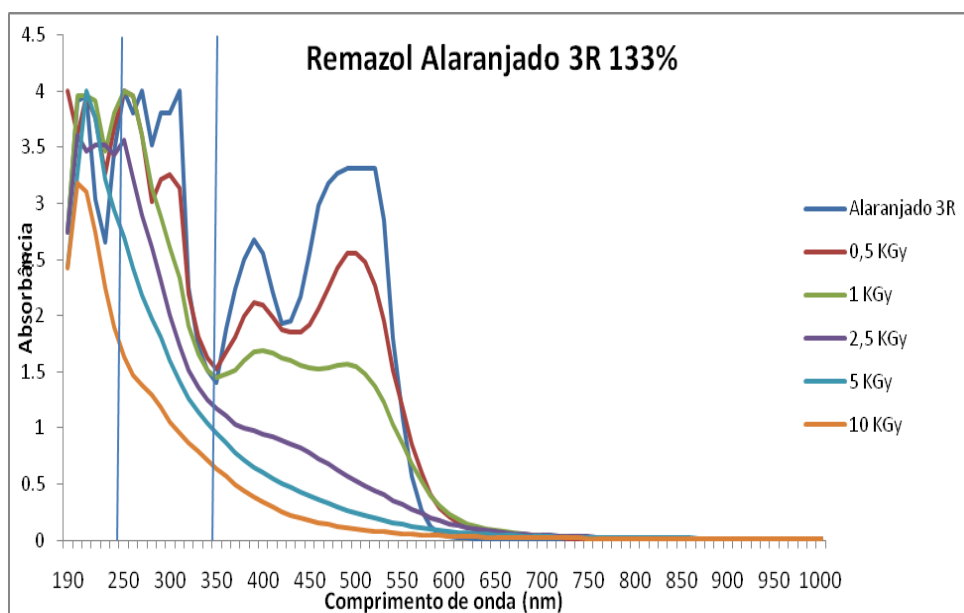


FIGURA 28. Espectro UV/visível do corante Remazol Alaranjado 3R 133% - sulfatoetilsulfona (200 mg L^{-1})- após irradiação com feixes de elétrons

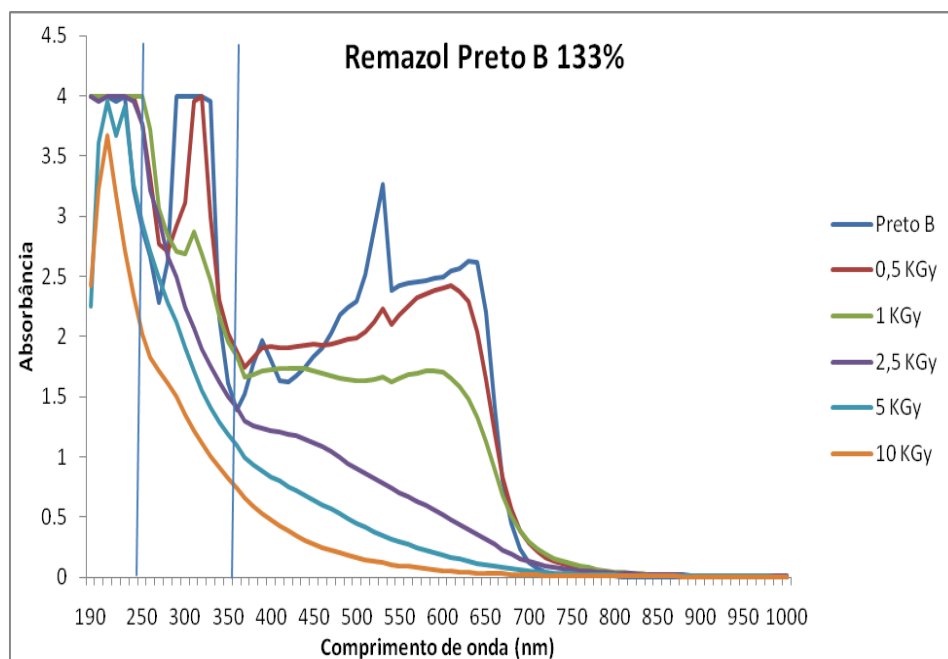


FIGURA 29. Espectro UV/visível do corante Remazol Preto B 133% - sulfatoetilsulfona (200 mg L^{-1})- após irradiação com feixes de elétrons

A razão pela qual os corantes azo são intensamente coloridos deve-se, em geral, ao fato da ligação azo (diazenodiila), -N=N-, fazer conjugação com dois anéis aromáticos. Essa conjugação fornece um sistema estendido de deslocamento de elétrons π e permite a absorção de luz na região do visível (Catanho *et al.*, 2006). A absorbância na região UV é característica dos anéis naftalenos e de outros compostos presentes na amostra (Paul *et al.*, 2011).

As reações do corante Reativo Preto 5 com as espécies reativas da radiólise da água foram estudadas pela técnica de radiólise de pulso por Djaka *et al.*, 2003. Nesse trabalho foi verificado que o elétron aquoso reage, preferencialmente, com o grupo azo formando o radical hidrazil como espécie primária (EQUAÇÃO 22). O átomo de hidrogênio produz subprodutos intermediários reativos similares ao e^-_{aq} , portanto, também reduz o grupo azo. Aproximadamente, 60 % do radical hidroxil reage com o grupo azo e 40 % com os anéis aromáticos, formando radicais ciclohexadienil como produtos primários.



Durante os experimentos os corantes foram irradiados na presença de oxigênio do ar e pH 6-7. Segundo Wojnaróvits *et al.*, 2008, Földváry *et al.*, 2007 e Paul *et al.* 2011, sob essas condições ocorre a captura dos átomos de hidrogênio (H^\bullet) e elétrons aquoso (e^-_{aq}) pelo oxigênio molecular (O_2) gerando radicais perhidroxil (HO_2^\bullet) e ânions superóxidos ($O_2^{\bullet-}$). Com isso, a descoloração e a degradação dos corantes ocorre via oxidação, principalmente, pela ação do radical hidroxil (OH^\bullet).

A porcentagem da redução da cor dos corantes foi calculada pelo monitoramento da diminuição da absorbância em 597 nm para o corante RPB e 494 nm para o RA3R (FIGURA 30). A eficácia do processo na redução da cor variou de acordo com a dose aplicada e com a estrutura química dos corantes. O corante RPB (0,5 kGy = 3,6 % ; 1 kGy = 31,61 % redução cor) apresentou maior redução da cor que o corante R3AR (0,5 kGy = 22,94 %; 1 kGy = 52,95 % redução cor) nas menores doses.

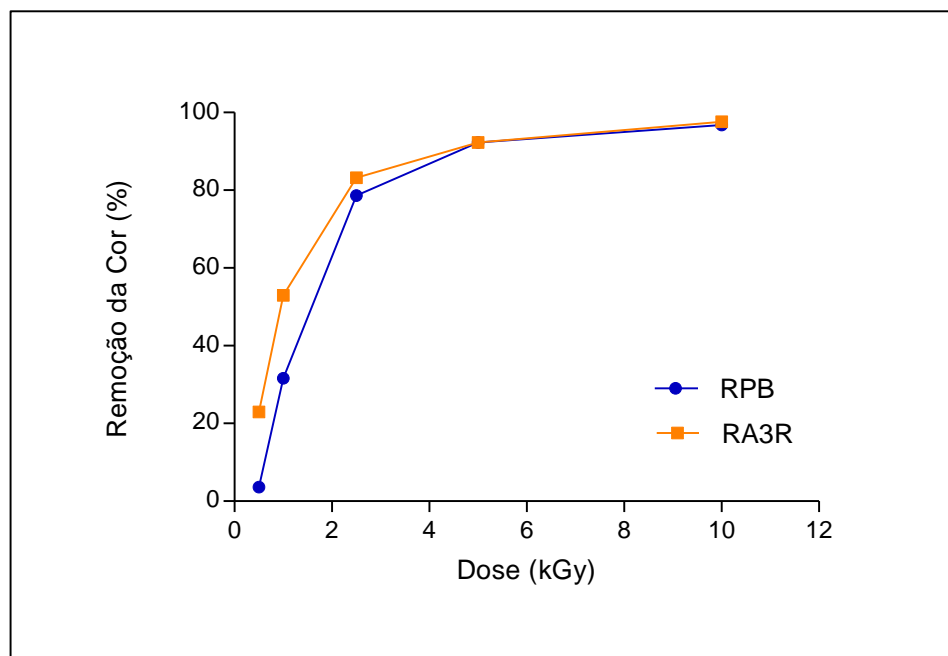


FIGURA 30. Porcentagem de descoloração dos corantes Remazol Preto B 133% e Remazol Alaranjado 3R 133% após a irradiação com diferentes doses de feixe de elétrons

Com a aplicação de baixas doses o rendimento na geração de espécies reativas é menor, o que explica uma menor porcentagem na redução dos corantes (Vahdat *et al.*, 2010).

Além disso, a diferença observada na porcentagem da redução da cor entre os corantes RPB e RA3R está diretamente ligada à estrutura química. A principal diferença está no número de grupos azo, o RPB apresenta dois grupos cromóforos (diazó) e o RA3R apenas um (monoazo).

Com o aumento da dose, ocorre o aumento da concentração das espécies reativas promovendo a maior descoloração dos corantes. A dose de 10 kGy foi eficaz na redução da cor dos corantes na concentração estudada (200 mg L^{-1}), com 97,64% de redução para o RPB e 96,8% para o RA3R.

5.5.1. Avaliação do pH e Condutividade

A diminuição do pH (FIGURA 31) e o aumento da condutividade (FIGURA 32) das soluções dos corantes foi diretamente proporcional ao aumento da dose, sugerindo a quebra das moléculas dos corantes em compostos ácidos orgânicos menores, tais como, ácido fórmico, ácido acético ou

ácidos dicarboxílicos (Ting e Jamaludin, 2008). O resultado corrobora o espectro UV/Vis obtido dos corantes após a dose de 10 kGy. O pico de absorção se desloca para a faixa do UV, especificamente na faixa de 190 - 240 nm característica dos compostos citados.

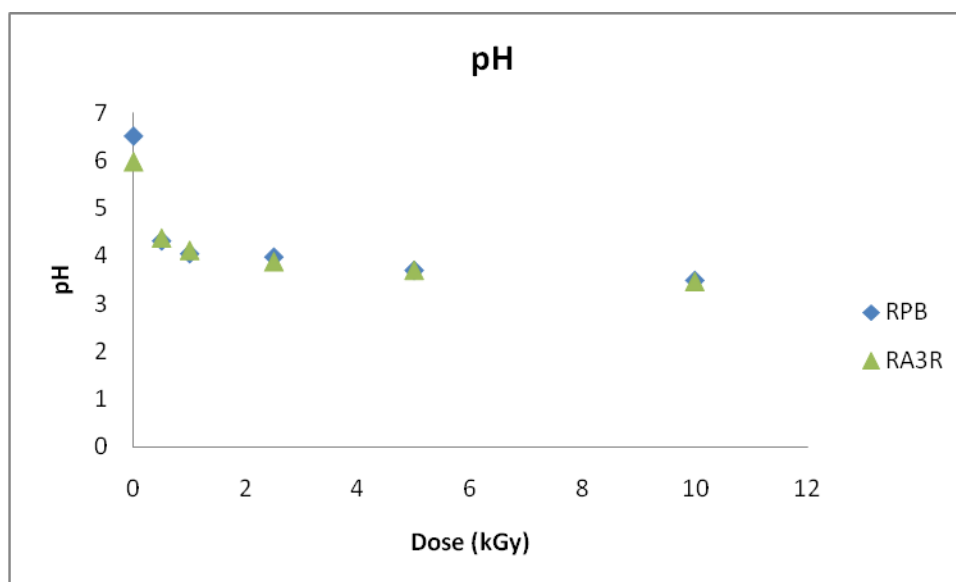


FIGURA 31. Variação do pH dos corantes Remazol Preto B 133% e Remazol Alaranjado 3R 133% - sulfatoetilsulfona (200 mg L^{-1}) – após irradiação com feixe de elétrons

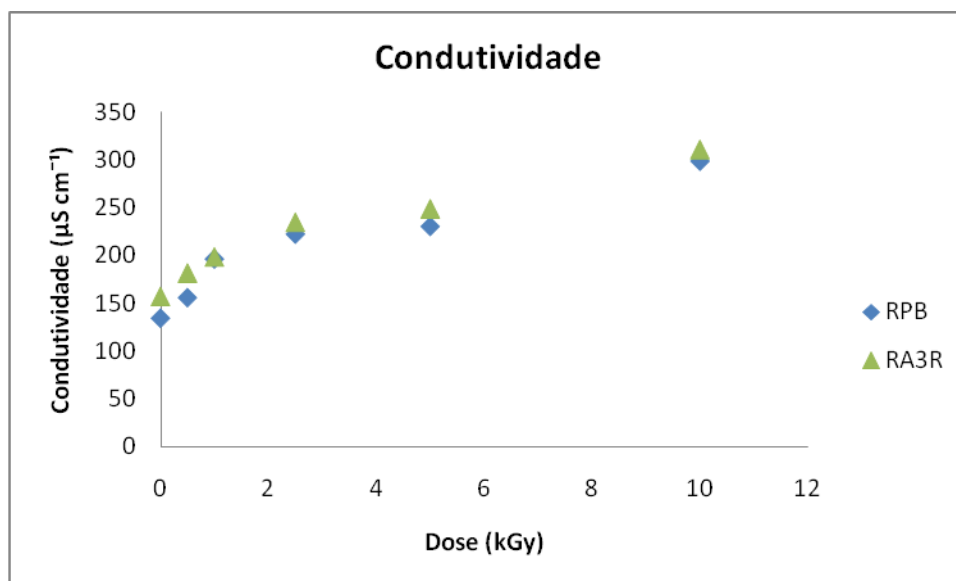


FIGURA 32. Variação da condutividade dos corantes Remazol Preto B 133% e Remazol Alaranjado 3R 133% - sulfatoetilsulfona (200 mg L^{-1}) – após irradiação com feixe de elétrons

5.5.2. Carbono Orgânico Total (COT)

O carbono orgânico total (COT) foi realizado apenas com o corante RPB, por se tratar do corante com a estrutura química mais complexa (FIGURA 33). O resultado indica que não houve diminuição do COT nas amostras irradiadas do corante, caracterizando que as doses aplicadas não foram capazes de mineralizar o corante. Esse resultado corrobora os resultados obtidos anteriormente com o espectro UV/Vis e pH dos corantes.

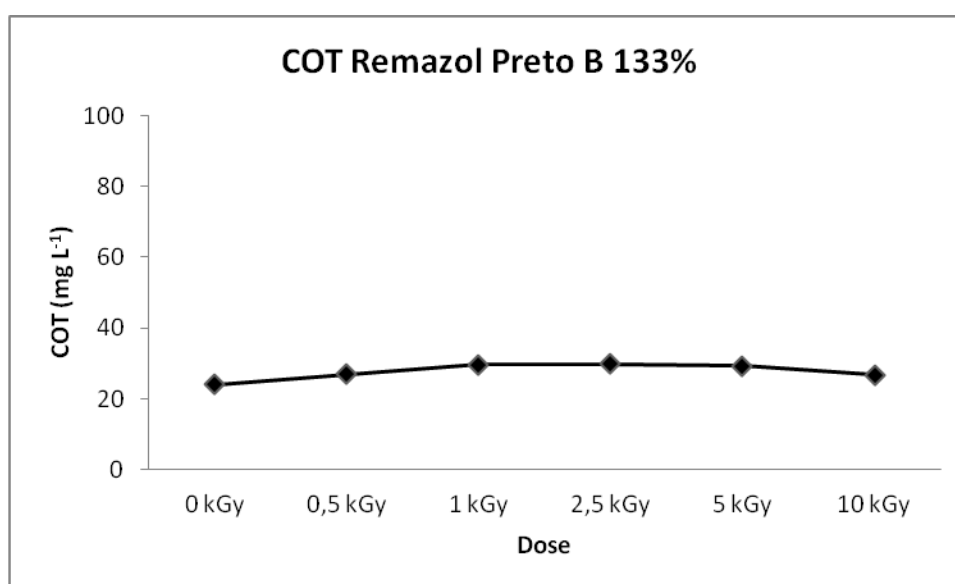


FIGURA 33. Concentração de COT presentes nas amostras do corante Remazo Preto B

5.5.3. Avaliação da Toxicidade Aguda dos Corantes Irrradiados com Feixe de Elétrons

Os organismos *V.fischeri* e *D.similis* foram utilizados para avaliar os possíveis efeitos biológicos dos produtos gerados com a irradiação dos corantes. Os resultados da toxicidade aguda dos corantes RPB e R3AR estão apresentados na TABELA 18 e 19 e FIGURA 34 e 35, respectivamente.

Os resultados indicam que a toxicidade aguda do organismo *V.fischeri* exposto ao RPB irradiado com 0,5, 1 e 2,5 kGy pouco variou em relação ao corante não irradiado. Com a dose de 5 kGy foi observado uma sensível diminuição da toxicidade (35,64 %). A dose de 10 kGy

apresentou valor de CE(I)₅₀ cerca de 2,5 vezes maior que o RPB não irradiado e uma redução de 59,62 % da toxicidade

O corante RPB, após a irradiação, apresentou valores de CE(I)₅₀ menores que o corante não irradiado para o organismo *D. similis*, indicando que os subprodutos gerados, em todas as doses utilizadas, foram mais tóxicos que o composto original.

TABELA 18. Toxicidade aguda para *V.fischeri* e *D.similis* do corante Remazol Preto B 133% após irradiação com feixes de elétrons

Corante Remazol Preto B 133% (sulfatoetilsulfona)				
Dose (kGy)	<i>V. fischeri</i>		<i>D. similis</i>	
	CE(I) ₅₀ _{15min} ; ppm	% Redução	CE(I) ₅₀ _{48h} ; ppm	% Redução
0	27,12 (24,42-30,16)		91,25 (65,24-154,54)	
0,5	23,70 (19,62-28,62)	NR	81,02 (67,14-97,14)	NR
1	27,40 (26,26-28,60)	NR	30,54 (14,68-67,62)	NR
2,5	25,06 (13,6-46,2)	NR	34,26 (28,26-40,52)	NR
5	42,14 (31,83-55,79)	35,64%	32,66 (20,96-42,76)	NR
10	67,0 (45,98-97,5)	59,52%	53,90 (43,60-66,64)	NR

NR = não houve redução

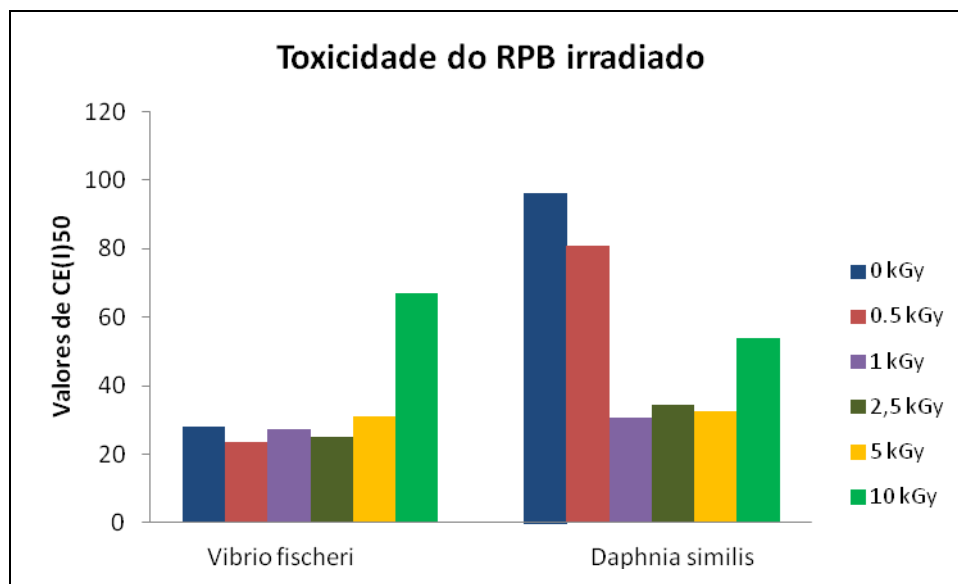


FIGURA 34. Toxicidade aguda para *V.fischeri* e *D.similis* do corante Remazol Preto B 133% após irradiação com feixes de elétrons

Os subprodutos gerados após a irradiação do RA3R com as doses 0,5 e 1 kGy foram mais tóxicos para *V.fischeri* que o corante não irradiado. Com o aumento da dose a toxicidade diminuiu, provavelmente, devido à maior degradação do composto. Com 2,5 kGy foi observado uma redução da toxicidade de 56,73 %, com 5 kGy uma redução de 81,29 % e 10 kGy uma redução de 82,95 % (TABELA 19).

Para *D.similis* houve uma redução da toxicidade que variou de 2 a 5 vezes para todas as doses, porém, com a presença de valores baixos de CE(I)₅₀. Os resultados indicam que os subprodutos gerados ainda são tóxicos para o organismo.

TABELA 19. Toxicidade aguda para *V.fischeri* e *D.similis* do corante Remazol Alaranjado 3R 133% após irradiação com feixes de elétrons

Corante Remazol Alaranjado 3R 133% (sulfatoetilsulfona)				
Dose (kGy)	<i>V. fischeri</i>		<i>D. similis</i>	
	CE(I)50 _{15min} ; ppm	% Redução	CE(I)50 _{48h} ; ppm	% Redução
0	12,72 (12,3-13,8)		4,42 (3,43-5,73)	
0,5	8,14 (6,20-10,66)	NR	14,62 (11,74-18,18)	69,76 %
1	10,04 (8,72-11,6)	NR	8,84 (2,98-23,60)	50 %
2,5	29,40 (28,06-30,80)	56,73 %	20,38 (14,54-28,58)	78,31 %
5	68,0 (28,0-156,0)	81,29 %	19,28 (14,68-25,32)	77,07 %
10	74,60 (59,60-93,40)	82,95 %	15,38 (12,98-18,24)	71,26 %

NR = não houve redução.

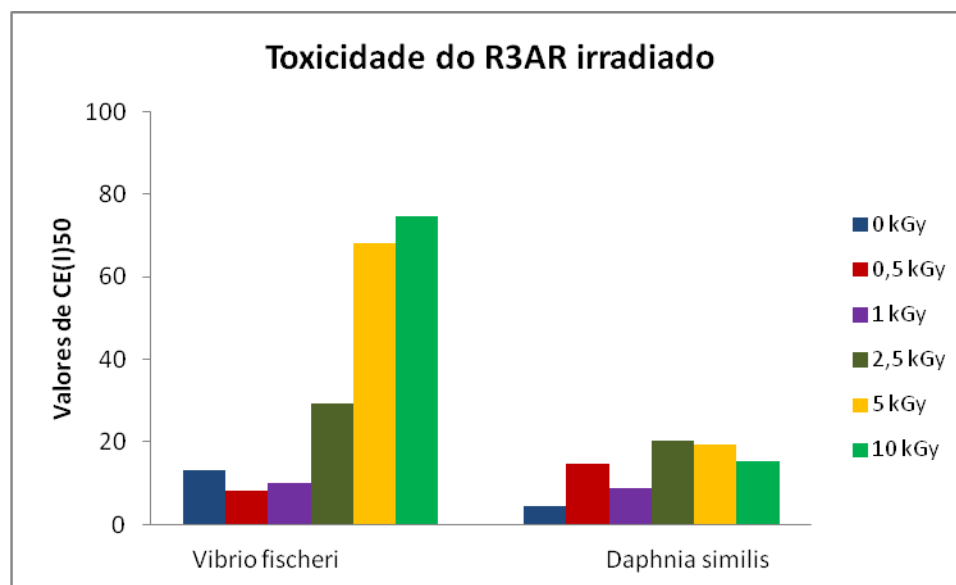


FIGURA 35. Toxicidade aguda para *V.fischeri* e *D.similis* do corante Remazol Alaranjado 3R 133% após irradiação com feixes de elétrons

6. CONCLUSÕES

- A modificação estrutural de um corante azo reativo nem sempre acarretará na formação de um composto mais tóxico. Entretanto, os menores valores de toxicidade aguda para os organismos testados foram observados na forma vinilsulfona dos corantes, sendo considerada como um risco em potencial aos ecossistemas aquáticos.
- O corante R3AR apresentou os menores valores de toxicidade aguda, entretando não foi observado efeito crônico com *C. dubia*. O organismo *D. similis* foi mais sensível ao corante R3AR do que *C. dubia*.
- O corante RPB foi genotóxico. Não foi observado esse efeito no corante RA3R
- A radiação de feixe de elétrons foi eficiente na redução da coloração dos corantes apresentando uma eficiência maior ou igual a 97 %. A estrutura química dos corantes influenciou diretamente na capacidade da redução de cor com as doses mais baixas de radiação. As doses de radiação utilizadas não foram capazes de mineralizar os corantes.
- A descoloração obtida pela radiação de feixe de elétrons não resultou diretamente na redução da toxicidade. Essa está diretamente ligada na maior degradação dos compostos.
- Os organismos utilizados para avaliar a toxicidade aguda dos subprodutos provenientes da degradação dos corantes com a radiação de feixe de elétrons apresentaram diferentes padrões de toxicidade, indicando a necessidade de utilizar mais de um organismo para uma melhor avaliação.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Após a radiação de feixe de elétrons os subprodutos gerados podem ser mais tóxicos que o composto original e também podem formar compostos genotóxicos. Utilizando corantes com conhecido grau de pureza, os subprodutos gerados poderão ser analisados para a identificação analítica, com auxílio de análises químicas (HPLC, RMN e outros). Em seguida, a toxicidade e genotoxicidade poderão ser determinadas com testes *in vitro* e *in vivo* de cada subproduto separadamente. Com isso, poderão ser conhecidos os subprodutos e quais são os responsáveis pelo efeito biológico.

O teste do Cometa adaptado ao caramujo é uma importante ferramenta para a avaliação genotóxica ambiental, mas também, pode ser utilizada para fazer estudos, tais como, avaliação de mecanismos de reparo e outros. O caramujo *B. glabrata* vem sendo utilizado como bioindicador, porém, existem poucos trabalhos que tratam de seus mecanismos de detoxificação e de reparo. Com a adaptação do teste do Cometa, poderão ser realizados experimentos para o melhor conhecimento deste bioindicador.

ANEXO I - ENSAIOS DE TOXICIDADE AGUDA COM *V. fischeri*

TABELA 1. Ensaio bruto de toxicidade aguda com *V. fischeri* exposta 15 min ao corante Remazol Alaranjado 3R sulfatoetilsulfona

<i>Vibrio fischeri</i> - Remazol Alaranjado 3R sulfatoetilsulfona						
	Concentração (mg L ⁻¹)					
	Controle(-)	5,115	10,23	20,47	40,95	81,90
I ₀	89,90	91,09	95,48	93,42	108,91	92,74
I ₁₅	75,24	53,36	45,88	30,35	22,95	10,19

CE(I)50_{15min} = 13,03 mg L⁻¹ (12,27-13,83)

TABELA 2. Ensaio bruto de toxicidade aguda com *V. fischeri* exposta 15 min ao corante Remazol Alaranjado 3R sulfatoetilsulfona

<i>Vibrio fischeri</i> - Remazol Alaranjado 3R sulfatoetilsulfona						
	Concentração (mg L ⁻¹)					
	Controle(-)	5,115	10,23	20,47	40,95	81,90
I ₀	117,91	88,98	100,22	112,62	106,02	96,45
I ₁₅	90,02	55,03	40,76	26,46	12,60	0,56

CE(I)50_{15min} = 12,41 mg L⁻¹ (10,55-14,60)

TABELA 3. Ensaio bruto de toxicidade aguda com *V. fischeri* exposta 15 min ao corante Remazol Alaranjado 3R vinilsulfona

<i>Vibrio fischeri</i> - Remazol Alaranjado 3R vinilsulfona						
	Concentração (mg L ⁻¹)					
	Controle(-)	5,115	10,23	20,47	40,95	81,90
I ₀	95,53	96,25	89,06	83,07	89,17	99,69
I ₁₅	78,02	69,51	53,31	41,89	36,35	29,09

CE(I)50_{15min} = 38,9 mg L⁻¹ (37,8-40,0)

TABELA 4. Ensaio bruto de toxicidade aguda com *V. fischeri* exposta 15 min ao corante Remazol Alaranjado 3R vinilsulfona

<i>Vibrio fischeri</i> - Remazol Alaranjado 3R vinilsulfona							
		Concentração (mg L ⁻¹)					
		Controle(-)	5,115	10,23	20,47	40,95	81,90
I ₀		81,02	93,20	93,32	93,13	89,15	87,09
I ₁₅		71,10	71,30	64,23	55,40	37,12	21,04
CE(I)50 _{15min} = 39,77 mg L ⁻¹ (36,04-43,87)							

TABELA 5. Ensaio bruto de toxicidade aguda com *V. fischeri* exposta 15 min ao corante Remazol Alaranjado 3R hidroxietilsulfona

<i>Vibrio fischeri</i> - Remazol Alaranjado 3R hidroxietilsulfona							
		Concentração (mg L ⁻¹)					
		Controle(-)	5,115	10,23	20,47	40,95	81,90
I ₀		92,91	113,89	107,21	111,86	112,17	106,43
I ₁₅		82,27	95,63	94,14	81,34	60,67	44,39
CE(I)50 _{15min} = 72,45 mg L ⁻¹ (60-51-86,75)							

TABELA 6. Ensaio bruto de toxicidade aguda com *V. fischeri* exposta 15 min ao corante Remazol Alaranjado 3R hidroxietilsulfona

<i>Vibrio fischeri</i> - Remazol Alaranjado 3R hidroxietilsulfona							
		Concentração (mg L ⁻¹)					
		Controle(-)	5,115	10,23	20,47	40,95	81,90
I ₀		102,3	109,76	106,7	98,97	102,23	96,33
I ₁₅		100,7	91,65	86,28	74,67	56,77	49,12
CE(I)50 _{15min} = 78,46 mg L ⁻¹ (63,08-97,58)							

TABELA 7. Ensaio bruto de toxicidade aguda com *V. fischeri* exposta 15 min ao corante Remazol Preto B sulfatoetilsulfona

<i>Vibrio fischeri</i> - Remazol Preto B sulfatoetilsulfona							
		Concentração (mg L ⁻¹)					
		Controle(-)	5,115	10,23	20,47	40,95	81,90
I ₀		98,3	94,99	98,70	90,90	97,74	76,91
I ₁₅		80,05	58,95	57,07	43,21	33,88	16,38
CE(I)50 _{15min} = 28,16 mg L ⁻¹ (26,41-30,0)							

TABELA 8. Ensaio bruto de toxicidade aguda com *V. fischeri* exposta 15 min ao corante Remazol Preto B sulfatoetilsulfona

<i>Vibrio fischeri</i> - Remazol Preto B sulfatoetilsulfona							
		Concentração (mg L ⁻¹)					
		Controle(-)	5,115	10,23	20,47	40,95	81,90
I ₀		91,83	85,66	82,13	82,75	78,69	77,79
I ₁₅		87,09	62,67	56,81	45,75	30,44	14,21
CE(I)50 _{15min} = 26,09 mg L ⁻¹ (22,44-30,33)							

TABELA 9. Ensaio bruto de toxicidade aguda com *V. fischeri* exposta 15 min ao corante Remazol Preto B vinilsulfona

<i>Vibrio fischeri</i> - Remazol Preto B vinilsulfona							
		Concentração (mg L ⁻¹)					
		Controle(-)	5,115	10,23	20,47	40,95	81,90
I ₀		92,97	97,36	87,70	90,58	94,57	88,66
I ₁₅		87,38	50,23	28,89	17,77	9,01	3,78
CE(I)50 _{15min} = 6,12 mg L ⁻¹ (5,72-6,56)							

TABELA 10. Ensaio bruto de toxicidade aguda com *V. fischeri* exposta 15 min ao corante Remazol Preto B vinilsulfona

<i>Vibrio fischeri</i> - Remazol Preto B vinilsulfona						
		Concentração (mg L ⁻¹)				
	Controle(-)	5,115	10,23	20,47	40,95	81,90
I ₀	105,02	97,15	103,12	101,69	99,79	86,92
I ₁₅	110,10	57,18	37,75	24,44	12,21	4,57
CE(I)50 _{15min} = 6,35 mg L ⁻¹ (5,65-7,14)						

TABELA 11. Ensaio bruto de toxicidade aguda com *V. fischeri* exposta 15 min ao corante Remazol Preto B hidroxietilsulfona

<i>Vibrio fischeri</i> - Remazol Preto B hidroxietilsulfona						
		Concentração (mg L ⁻¹)				
	Controle(-)	5,115	10,23	20,47	40,95	81,90
I ₀	97,41	111,59	99,99	98,93	112,21	117,65
I ₁₅	80,49	75,14	55,63	40,84	27,11	14,09
CE(I)50 _{15min} = 19,39 mg L ⁻¹ (18,21-20,66)						

TABELA 12. Ensaio bruto de toxicidade aguda com *V. fischeri* exposta 15 min ao corante Remazol Preto B hidroxietilsulfona

<i>Vibrio fischeri</i> - Remazol Preto B hidroxietilsulfona						
		Concentração (mg L ⁻¹)				
	Controle(-)	5,115	10,23	20,47	40,95	81,90
I ₀	128,20	102,66	106,70	134,56	117,23	118,10
I ₁₅	131,51	88,90	85,54	75,67	39,78	12,49
CE(I)50 _{15min} = 23,62 mg L ⁻¹ (19,83-28,14)						

TABELA 13. Ensaio bruto de toxicidade aguda com *V. fischeri* exposta 15 min ao corante Remazol Preto B sulfatoetilsulfona irradiado com 0,5 kGy

<i>Vibrio fischeri</i> - Remazol Preto B (0,5 kGy)							
		Concentração (%)					
		Controle(-)	2,557	5,115	10,23	20,47	40,95
I ₀		138,83	146,65	116,05	132,03	112,20	128,89
I ₁₅		93,71	83,87	60,67	47,95	24,84	11,93
CE(I)50 _{15min} = 23,70 mg L ⁻¹ (19,62-28,62)							

TABELA 14. Ensaio bruto de toxicidade aguda com *V. fischeri* exposta 15 min ao corante Remazol Preto B sulfatoetilsulfona irradiado com 1,0 kGy

<i>Vibrio fischeri</i> - Remazol Preto B (1,0 kGy)						
		Concentração (%)				
		Controle(-)	5,115	10,23	20,47	40,95
I ₀		106,26	111,64	106,87	110,03	99,9
I ₁₅		61,57	50,43	50,43	24,27	10,86
CE(I)50 _{15min} = 27,4 mg L ⁻¹ (26,26-28,60)						

TABELA 15. Ensaio bruto de toxicidade aguda com *V. fischeri* exposta 15 min ao corante Remazol Preto B sulfatoetilsulfona irradiado com 2,5 kGy

<i>Vibrio fischeri</i> - Remazol Preto B (2,5 kGy)						
		Concentração (%)				
		Controle(-)	5,115	10,23	20,47	40,95
I ₀		118,91	125,01	111,10	79,50	118,02
I ₁₅		104,62	66,99	62,11	37,71	25,92
CE(I)50 _{15min} = 25,06 mg L ⁻¹ (13,6-46,2)						

TABELA 16. Ensaio bruto de toxicidade aguda com *V. fischeri* exposta 15 min ao corante Remazol Preto B sulfatoetilsulfona irradiado com 5,0 kGy

<i>Vibrio fischeri</i> - Remazol Preto B (5,0 kGy)						
		Concentração (%)				
		Controle(-)	5,115	10,23	20,47	40,95
I ₀	103,50	94,33	97,59	101,97	91,64	
I ₁₅	107,0	22,30	14,03	8,31	2,6	
CE(I)50 _{15min} = 42,14 mg L ⁻¹ (31,83-55,79)						

TABELA 17. Ensaio bruto de toxicidade aguda com *V. fischeri* exposta 15 min ao corante Remazol Preto B sulfatoetilsulfona irradiado com 10 kGy

<i>Vibrio fischeri</i> - Remazol Preto B (10 kGy)							
		Concentração (%)					
		Controle(-)	2,557	5,115	10,23	20,47	40,95
I ₀	83,44	90,22	99,08	95,41	92,29	106,91	
I ₁₅	88,61	84,03	87,22	78,07	59,81	45,09	
CE(I)50 _{15min} = 67,0 mg L ⁻¹ (45,98-97,5)							

TABELA 18. Ensaio bruto de toxicidade aguda com *V. fischeri* exposta 15 min ao corante Remazol Alaranjado 3R sulfatoetilsulfona irradiado com 0,5 kGy

<i>Vibrio fischeri</i> - Remazol Alaranjado 3R (0,5 kGy)							
		Concentração (%)					
		Controle(-)	2,557	5,115	10,23	20,47	40,95
I ₀	82,70	107,19	103,44	88,27	100,31	95,70	
I ₁₅	89,68	64,07	56,77	32,66	18,33	6,72	
CE(I)50 _{15min} = 8,14 mg L ⁻¹ (6,20-10,66)							

TABELA 19. Ensaio bruto de toxicidade aguda com *V. fischeri* exposta 15 min ao corante Remazol Alaranjado 3R sulfatoetilsulfona irradiado com 1,0 kGy

<i>Vibrio fischeri</i> - Remazol Alaranjado 3R (1,0 kGy)						
		Concentração (%)				
	Controle(-)	2,557	5,115	10,23	20,47	40,95
I ₀	82,59	108,18	111,75	97,59	114,78	102,95
I ₁₅	82,25	71,84	51,28	35,48	22,85	7,86

CE(I)50_{15min} = 10,04 mg L⁻¹ (8,72-11,6)

TABELA 20. Ensaio bruto de toxicidade aguda com *V. fischeri* exposta 15 min ao corante Remazol Alaranjado 3R sulfatoetilsulfona irradiado com 2,5 kGy

<i>Vibrio fischeri</i> - Remazol Alaranjado 3R (2,5 kGy)						
		Concentração (%)				
	Controle(-)	2,557	5,115	10,23	20,47	40,95
I ₀	100,8	128,07	96,53	103,93	104,49	122,96
I ₁₅	111,6	109,33	80,48	68,91	48,98	32,94

CE(I)50_{15min} = 29,40 mg L⁻¹ (28,06-30,80)

TABELA 21. Ensaio bruto de toxicidade aguda com *V. fischeri* exposta 15 min ao corante Remazol Alaranjado 3R sulfatoetilsulfona irradiado com 5,0 kGy

<i>Vibrio fischeri</i> - Remazol Alaranjado 3R (5,0 kGy)						
		Concentração (%)				
	Controle(-)	5,115	10,23	20,47	40,95	81,9
I ₀	114,72	126,96	102,46	121,37	91,79	117,06
I ₁₅	83,39	88,40	69,46	62,61	44,80	6,37

CE(I)50_{15min} = 68,0 mg L⁻¹ (28,0-156,0)

TABELA 22. Ensaio bruto de toxicidade aguda com *V. fischeri* exposta 15 min ao corante Remazol Alaranjado 3R sulfatoetilsulfona irradiado com 10 kGy

<i>Vibrio fischeri</i> - Remazol Alaranjado 3R (%)							
		Concentração (mg L ⁻¹)					
		Controle(-)	5,115	10,23	20,47	40,95	81,9
I ₀		143,51	144,2	144,89	136,9	118,27	114,13
I ₁₅		132,31	124,5	118,36	96,64	76,88	46,87

CE(I)50_{15min} = 74,60 mg L⁻¹ (59,60-93,40)

ANEXO II - ENSAIOS DE TOXICIDADE AGUDA COM *D.similis*

TABELA 1. Ensaio bruto de toxicidade aguda com *D.similis* exposta 48h ao corante Remazol Preto B sulfatoetilsulfona

Concentração (mg L ⁻¹)	Org. Imóveis por Réplica - <i>Daphnia similis</i>				Total	pH
	1	2	3	4		
controle	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20	7,90
75	3/5	0/5	2/5	3/5	8/20	7,81
100	0/5	3/5	3/5	4/5	10/20	7,83
200	4/5	1/5	3/5	4/5	12/20	7,78
400	3/5	3/5	3/5	3/5	12/20	7,87
600	5/5	5/5	2/5	3/5	15/20	7,82

CE(I)50_{48h} = 110,67 mg L⁻¹ (55,77-219,60)

TABELA 2. Ensaio bruto de toxicidade aguda com *D.similis* exposta 48h ao corante Remazol Preto B sulfatoetilsulfona

Concentração (mg L ⁻¹)	Org. Imóveis por Réplica - <i>Daphnia similis</i>				Total	pH
	1	2	3	4		
controle	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20	7,93
75	1/5	1/5	1/5	4/5	7/20	7,90
100	4/5	4/5	5/5	4/5	17/20	7,83
200	3/5	2/5	4/5	3/5	12/20	7,91
400	3/5	2/5	2/5	3/5	10/20	7,85
600	5/5	3/5	2/5	5/5	15//20	7,91

CE(I)50_{48h} = 80,88 mg L⁻¹ (65,67-99,61)

TABELA 3. Ensaio bruto de toxicidade aguda com *D.similis* exposta 48h ao corante Remazol Preto B vinilsulfona

Concentração (mg L ⁻¹)	Org. Imóveis por Réplica - <i>Daphnia similis</i>				Total	pH
	1	2	3	4		
controle	0/5	0/5	0/5	1/5	1/20	7,98
100	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20	7,93
200	1/5	0/5	2/5	0/5	3/20	7,94
400	2/5	2/5	2/5	3/5	9/20	7,99
600	3/5	2/5	4/5	4/5	13/20	7,93
800	5/5	5/5	4/5	5/5	19/20	7,95

CE(I)50_{48h} = 431,48 mg L⁻¹ (359,76-517,60)

TABELA 4. Ensaio bruto de toxicidade aguda com *D.similis* exposta 48h ao corante Remazol Preto B vinilsulfona

Concentração (mg L ⁻¹)	Org. Imóveis por Réplica - <i>Daphnia similis</i>				Total	pH
	1	2	3	4		
controle	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20	7,76
100	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20	7,78
250	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20	7,88
500	2/5	0/5	1/5	3/5	6/20	7,74
750	5/5	5/5	5/5	5/5	20/20	7,76
1000	5/5	5/5	5/5	5/5	20/20	7,73

CE(I)50_{48h} = 519,33 mg L⁻¹ (464,04-581,22)

TABELA 5. Ensaio bruto de toxicidade aguda com *D.similis* exposta 48h ao corante Remazol Preto B hidroxietilsulfona

Concentração (mg L ⁻¹)	Org. Imóveis por Réplica - <i>Daphnia similis</i>				Total	pH
	1	2	3	4		
controle	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20	8,1
100	1/5	2/5	0/5	1/5	4/20	7,98
200	2/5	3/5	1/5	0/5	6/20	7,95
400	3/5	2/5	2/5	4/5	11/20	7,99
600	5/5	4/5	2/5	3/5	14/20	7,80
800	5/5	5/5	5/5	2/5	17/20	7,97

CE(I)50_{48h} = 332 mg L⁻¹ (235,05-471,65)

TABELA 6. Ensaio bruto de toxicidade aguda com *D.similis* exposta 48h ao corante Remazol Preto B hidroxietilsulfona

Concentração (mg L ⁻¹)	Org. Imóveis por Réplica - <i>Daphnia similis</i>				Total	pH
	1	2	3	4		
controle	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20	7,84
100	1/5	0/5	1/5	0/5	2/20	7,80
200	2/5	1/5	0/5	1/5	4/20	7,67
400	3/5	1/5	1/5	2/5	7/20	7,88
600	4/5	5/5	2/5	4/5	15/20	7,84
800	5/5	5/5	5/5	3/5	18/20	7,83

CE(I)50_{48h} = 480,4 mg L⁻¹ (212,04-512,56)

TABELA 7. Ensaio bruto de toxicidade aguda com *D.similis* exposta 48h ao corante Remazol Alaranjado 3R sulfatoetilsulfona

Concentração (mg L ⁻¹)	Org. Imóveis por Réplica - <i>Daphnia similis</i>				Total	pH
	1	2	3	4		
controle	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20	8,2
0,78125	0/5	2/5	1/5	1/5	4/20	8,1
1,5625	0/5	2/5	2/5	1/5	5/20	7,98
3,125	2/5	2/5	2/5	1/5	7/20	8,0
6,25	5/5	5/5	1/5	5/5	16/20	7,99
12,5	5/5	4/5	4/5	5/5	18/20	7,93
25	3/5	4/5	4/5	3/5	14/20	7,89
50	5/5	4/5	4/5	5/5	18/20	8,1

CE(I)50_{48h} = 3,51 mg L⁻¹ (2,44-5,05)

TABELA 8. Ensaio bruto de toxicidade aguda com *D.similis* exposta 48h ao corante Remazol Alaranjado 3R sulfatoetilsulfona

Concentração (mg L ⁻¹)	Org. Imóveis por Réplica - <i>Daphnia similis</i>				Total	pH
	1	2	3	4		
controle	0/5	0/5	0/5	1/5	1/20	7,88
0,78125	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20	7,85
1,5625	2/5	1/5	0/5	0/5	3/5	7,77
3,125	2/5	0/5	0/5	1/5	3/5	7,83
6,25	3/5	3/5	4/5	3/5	13/20	7,9
12,5	5/5	5/5	5/5	3/5	18/20	7,82
25	5/5	5/5	5/5	5/5	20/20	7,70
50	5/5	3/5	4/5	5/5	17/20	7,72

CE(I)50_{48h} = 5,32 mg L⁻¹ (4,42-6,411)

TABELA 9. Ensaio bruto de toxicidade aguda com *D.similis* exposta 48h ao corante Remazol Alaranjado 3R vinilsulfona

Concentração (mg L ⁻¹)	Org. Imóveis por Réplica - <i>Daphnia similis</i>				Total	pH
	1	2	3	4		
controle	1/5	0/5	0/5	1/5	2/20	8,2
0,39065	2/5	3/5	4/5	1/5	10/20	7,99
0,78125	3/5	4/5	4/5	5/5	16/20	8,2
1,5625	2/5	5/5	4/5	4/5	15/20	8,1
3,125	4/5	4/5	5/5	4/5	17/20	7,98
6,25	5/5	5/5	5/5	4/5	19/20	7,89
12,5	5/5	5/5	5/5	5/5	20/20	8,3
25	5/5	5/5	4/5	5/5	19/20	8,1
50	5/5	5/5	5/5	4/5	19/20	7,90

CE(I)50_{48h} = 0,48 mg L⁻¹ (0,34-0,66)

TABELA 10. Ensaio bruto de toxicidade aguda com *D.similis* exposta 48h ao corante Remazol Alaranjado 3R vinilsulfona

Concentração (mg L ⁻¹)	Org. Imóveis por Réplica - <i>Daphnia similis</i>				Total	pH
	1	2	3	4		
controle	0/5	1/5	0/5	0/5	1/20	7,99
0,39065	2/5	1/5	2/5	1/5	6/20	7,95
0,78125	5/5	2/5	4/5	3/5	14/20	7,91
1,5625	5/5	3/5	5/5	2/5	15/20	7,83
3,125	5/5	5/5	4/5	3/5	17/20	7,88
6,25	5/5	5/5	5/5	3/5	18/20	7,78
12,5	4/5	5/5	4/5	3/5	16/20	7,89
25	4/5	5/5	5/5	4/5	18/20	7,94
50	5/5	5/5	3/5	5/5	19/20	7,86

CE(I)50_{48h} = 0,59 mg L⁻¹ (0,42-0,83)

TABELA 11. Ensaio bruto de toxicidade aguda com *D.similis* exposta 48h ao corante Remazol Alaranjado 3R hidroxietilsulfona

Concentração (mg L ⁻¹)	Org. Imóveis por Réplica - <i>Daphnia similis</i>				Total	pH
	1	2	3	4		
controle	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20	8,4
0,39065	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20	7,9
0,78125	0/5	1/5	0/5	2/5	3/20	8,2
1,5625	2/5	0/5	0/5	2/5	4/20	8,1
3,125	2/5	4/5	2/5	0/5	8/20	7,98
6,25	5/5	5/5	5/5	4/5	19/20	8,1
12,5	4/5	5/5	5/5	5/5	19/20	7,99
25	5/5	5/5	5/5	5/5	20/20	8,2
50	5/5	5/5	5/5	5/5	20/20	7,92

CE(I)50_{48h} = 2,82 mg L⁻¹ (2,21-3,6)

TABELA 12. Ensaio bruto de toxicidade aguda com *D.similis* exposta 48h ao corante Remazol Alaranjado 3R hidroxietilsulfona

Concentração (mg L ⁻¹)	Org. Imóveis por Réplica - <i>Daphnia similis</i>				Total	pH
	1	2	3	4		
controle	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20	7,99
0,39065	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20	7,92
0,78125	0/5	1/5	3/5	0/5	4/20	7,89
1,5625	0/5	1/5	1/5	1/5	3/5	7,7
3,125	3/5	5/5	3/5	2/5	13/20	7,6
6,25	5/5	2/5	3/5	5/5	15/20	7,81
12,5	5/5	5/5	5/5	3/5	18/20	7,98
25	5/5	5/5	5/5	5/5	20/20	7,82
50	5/5	5/5	5/5	5/5	20/20	7,68

CE(I)50_{48h} = 2,82 mg L⁻¹ (2,14-3,71)

TABELA 13. Ensaio bruto de toxicidade aguda com *D.similis* exposta 48h ao corante Remazol Preto B sulfatetilsulfona irradiado com 0,5 kGy (CE(I)50_{48h} em mg L⁻¹)

Concentração (%)	Org. Imóveis por Réplica - <i>Daphnia similis</i>				Total	pH
	1	2	3	4		
controle	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20	7,60
12,5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20	7,40
25	1/5	2/5	1/5	1/5	5/20	7,50
50	3/5	2/5	3/5	2/5	10/20	7,18
75	4/5	5/5	4/5	5/5	18/20	7,8
100	5/5	5/5	5/5	5/5	20/20	7,4
100	5/5	5/5	5/5	5/5	20/20	4,5

CE(I)50_{48h} = 81,02 mg L⁻¹ (67,14-97,14)

TABELA 14. Ensaio bruto de toxicidade aguda com *D.similis* exposta 48h ao corante Remazol Preto B sulfatetilsulfona irradiado com 1,0 kGy (CE(I)50_{48h} em mg L⁻¹)

Concentração (%)	Org. Imóveis por Réplica - <i>Daphnia similis</i>				Total	pH
	1	2	3	4		
controle	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20	7,4
12,5	2/5	3/5	2/5	2/5	9/20	7,6
25	3/5	3/5	3/5	3/5	12/20	7,5
50	3/5	3/5	3/5	5/5	14/20	7,55
75	5/5	5/5	5/5	5/5	20/20	7,5
100	5/5	5/5	5/5	5/5	20/20	7,62
100	5/5	5/5	5/5	5/5	20/20	4,12

CE(I)50_{48h} = 30,54 mg L⁻¹ (14,68-67,62)

TABELA 15. Ensaio bruto de toxicidade aguda com *D.similis* exposta 48h ao corante Remazol Preto B sulfatetilsulfona irradiado com 2,5 kGy (CE(I)50_{48h} em mg L⁻¹)

Concentração (%)	Org. Imóveis por Réplica - <i>Daphnia similis</i>				Total	pH
	1	2	3	4		
controle	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20	8,31
12,5	3/5	0/5	0/5	2/5	5/20	8,21
25	4/5	5/5	4/5	3/5	16/20	8,10
50	5/5	3/5	3/5	5/5	16/20	8,05
75	5/5	5/5	5/5	5/5	20/20	7,69
100	5/5	5/5	5/5	5/5	20/20	6,56
100	5/5	5/5	5/5	5/5	20/20	3,79

CE(I)50_{48h} = 34,26 mg L⁻¹ (28,26-40,52)

TABELA 16. Ensaio bruto de toxicidade aguda com *D.similis* exposta 48h ao corante Remazol Preto B sulfatetilsulfona irradiado com 5,0 kGy (CE(I)50_{48h} em mg L⁻¹)

Concentração (%)	Org. Imóveis por Réplica - <i>Daphnia similis</i>				Total	pH
	1	2	3	4		
controle	0/5	0/5	0/5	1/5	1/20	8,20
3,125	0/5	1/5	0/5	1/5	2/20	8,4
6,25	0/5	0/5	2/5	2/5	4/20	7,99
12,5	3/5	4/5	0/5	2/5	9/20	8,0
25	4/5	3/5	4/5	4/5	15/20	8,10
50	5/5	3/5	4/5	3/5	15/20	7,97
75	5/5	5/5	5/5	5/5	20/20	7,96
100	5/5	5/5	5/5	5/5	20/20	7,90
100	5/5	5/5	5/5	5/5	20/20	3,49

CE(I)50_{48h} = 32,66 mg L⁻¹ (20,96-42,76)

TABELA 17. Ensaio bruto de toxicidade aguda com *D.similis* exposta 48h ao corante Remazol Preto B sulfatetilsulfona irradiado com 10 kGy (CE(I)50_{48h} em mg L⁻¹)

Concentração (%)	Org. Imóveis por Réplica - <i>Daphnia similis</i>				Total	pH
	1	2	3	4		
controle	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20	7,7
12,5	1/5	0/5	0/5	2/5	3/20	7,5
25	2/5	2/5	2/5	2/5	8/20	7,6
50	3/5	4/5	4/5	5/5	16/20	7,58
75	5/5	5/5	5/5	5/5	20/20	7,55
100	5/5	5/5	5/5	5/5	20/20	7,54
100	5/5	5/5	5/5	5/5	20/20	3,25

CE(I)50_{48h} = 53,90 mg L⁻¹ (43,60-66,64)

TABELA 18. Ensaio bruto de toxicidade aguda com *D.similis* exposta 48h ao corante Remazol Alaranjado 3R sulfatetilsulfona irradiado com 0,5 kGy (CE(I)50_{48h} em mg L⁻¹)

Concentração (%)	Org. Imóveis por Réplica - <i>Daphnia similis</i>				Total	pH
	1	2	3	4		
controle	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20	8,16
3,125	0/5	1/5	1/5	1/5	3/20	8,15
6,25	0/5	2/5	2/5	2/5	6/20	8,11
12,5	5/5	4/5	5/5	5/5	19/20	8,09
25	5/5	5/5	5/5	5/5	20/20	8,0
50	5/5	3/5	5/5	5/5	18/20	7,78
75	5/5	5/5	5/5	5/5	20/20	7,29
100	5/5	5/5	5/5	5/5	20/20	7,90
100	5/5	5/5	5/5	5/5	20/20	4,25

CE(I)50_{48h} = 14,62 mg L⁻¹ (11,74-18,18)

TABELA 19. Ensaio bruto de toxicidade aguda com *D.similis* exposta 48h ao corante Remazol Alaranjado 3R sulfatetilsulfona irradiado com 1,0 kGy (CE(I)50_{48h} em mg L⁻¹)

Concentração (%)	Org. Imóveis por Réplica - <i>Daphnia similis</i>				Total	pH
	1	2	3	4		
controle	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20	8,09
3,125	0/5	3/5	3/5	3/5	9/20	8,04
6,25	3/5	3/5	3/5	2/5	11/20	8,01
12,5	5/5	4/5	3/5	2/5	14/20	7,95
25	5/5	5/5	5/5	4/5	19/20	7,84
50	5/5	4/5	5/5	5/5	19/20	7,56
75	5/5	5/5	4/5	5/5	19/20	7,08
100	5/5	5/5	5/5	5/5	20/20	7,90
100	5/5	5/5	5/5	5/5	20/20	4,03

CE(I)50_{48h} = 8,84 mg L⁻¹ (2,98-23,60)

TABELA 20. Ensaio bruto de toxicidade aguda com *D.similis* exposta 48h ao corante Remazol Alaranjado 3R sulfatetilsulfona irradiado com 2,5 kGy (CE(I)50_{48h} em mg L⁻¹)

Concentração (%)	Org. Imóveis por Réplica - <i>Daphnia similis</i>				Total	pH
	1	2	3	4		
controle	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20	8,21
3,125	0/5	1/5	1/5	0/5	2/20	8,2
6,25	1/5	3/5	2/5	2/5	8/20	8,19
12,5	4/5	4/5	4/5	3/5	15/20	8,16
25	3/5	3/5	3/5	4/5	13/20	8,09
50	4/5	5/5	4/5	3/5	16/20	7,96
75	5/5	5/5	5/5	5/5	20/20	7,47
100	5/5	5/5	5/5	5/5	20/20	6,52
100	5/5	5/5	5/5	5/5	20/20	3,89

CE(I)50_{48h} = 20,38 mg L⁻¹ (14,54-28,58)

TABELA 21. Ensaio bruto de toxicidade aguda com *D.similis* exposta 48h ao corante Remazol Alaranjado 3R sulfatetilsulfona irradiado com 5 kGy (CE(I)50_{48h} em mg L⁻¹)

Concentração (%)	Org. Imóveis por Réplica - <i>Daphnia similis</i>				Total	pH
	1	2	3	4		
controle	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20	8,19
3,125	0/5	1/5	1/5	0/5	2/20	8,17
6,25	1/5	3/5	2/5	0/5	6/20	8,15
12,5	4/5	4/5	2/5	2/5	12/20	8,13
25	4/5	3/5	3/5	5/5	18/20	8,09
50	4/5	5/5	4/5	4/5	17/20	7,94
75	5/5	5/5	5/5	5/5	20/20	7,28
100	5/5	5/5	5/5	5/5	20/20	6,35
100	5/5	5/5	5/5	5/5	20/20	3,54

CE(I)50_{48h} = 19,28 mg L⁻¹ (14,68-25,32)

TABELA 22. Ensaio bruto de toxicidade aguda com *D.similis* exposta 48h ao corante Remazol Alaranjado 3R sulfatetilsulfona irradiado com 10 kGy (CE(I)50_{48h} em mg L⁻¹)

Concentração (%)	Org. Imóveis por Réplica - <i>Daphnia similis</i>				Total	pH
	1	2	3	4		
controle	0/5	0/5	0/5	1/5	1/20	8,09
3,125	0/5	1/5	0/5	0/5	1/20	8,15
6,25	1/5	3/5	2/5	1/5	7/20	8,06
12,5	4/5	4/5	5/5	5/5	18/20	7,96
25	5/5	5/5	5/5	5/5	20/20	7,81
50	4/5	5/5	4/5	5/5	18/20	7,39
75	5/5	5/5	5/5	5/5	20/20	7,46
100	5/5	5/5	5/5	5/5	20/20	7,2
100	5/5	5/5	5/5	5/5	20/20	3,24

CE(I)50_{48h} = 15,38 mg L⁻¹ (12,98-18,24)

TABELA 22. Ensaio bruto de toxicidade aguda com *B.glabrata* exposto 72h ao corante Remazol Preto B sulfatetilsulfona

Concentração (mg L ⁻¹)	Mortalidade por Réplica - <i>Biomphalaria glabrata</i>			Total
	1	2	3	
controle	0/10	0/10	0/10	0/30
100	0/10	0/10	0/10	0/30
1000	0/10	0/10	0/10	0/30
2000	2/10	0/10	0/10	2/30
5000	1/10	2/10	2/10	5/30

CL50_{72h} não calculável

TABELA 23. Ensaio bruto de toxicidade aguda com *B.glabrata* exposto 72h ao corante Remazol Preto B vinilsulfona

Concentração (mg L ⁻¹)	Mortalidade por Réplica - <i>Biomphalaria glabrata</i>			Total
	1	2	3	
controle	0/10	0/10	0/10	0/30
100	0/10	0/10	1/10	1/30
1000	0/10	0/10	0/10	0/30
2000	0/10	0/10	0/10	0/30
5000	10/10	8/10	5/10	23/30

CL50_{72h} = 1571,53 mg L⁻¹ (1434,75-1721,36)

TABELA 24. Ensaio bruto de toxicidade aguda com *B.glabrata* exposto 72h ao corante Remazol Preto B hidroxietilsulfona

Concentração (mg L ⁻¹)	Mortalidade por Réplica - <i>Biomphalaria glabrata</i>			Total
	1	2	3	
controle	0/10	0/10	0/10	0/30
100	0/10	0/10	0/10	0/30
1000	0/10	0/10	0/10	0/30
2000	0/10	0/10	0/10	0/30
5000	0/10	1/10	1/10	2/30

CL50_{72h} não calculável

TABELA 25. Ensaio bruto de toxicidade aguda com *B.glabrata* exposto 72h ao corante Remazol Alaranjado 3R sulfatoetilsulfona

Concentração (mg L ⁻¹)	Mortalidade por Réplica - <i>Biomphalaria glabrata</i>			Total
	1	2	3	
controle	0/10	0/10	1/10	1/30
100	0/10	0/10	0/10	0/30
1000	0/10	0/10	0/10	0/30
2000	0/10	1/10	0/10	1/30
5000	3/10	0/10	0/10	3/30

CL50_{72h} não calculável

TABELA 25. Ensaio bruto de toxicidade aguda com *B.glabrata* exposto 72h ao corante Remazol Alaranjado 3R vinilsulfona

Concentração (mg L ⁻¹)	Mortalidade por Réplica - <i>Biomphalaria glabrata</i>			Total
	1	2	3	
controle	0/10	0/10	0/10	0/30
100	0/10	0/10	0/10	0/30
1000	0/10	1/10	0/10	1/30
2000	1/10	0/10	2/10	3/30
5000	4/10	1/10	1/10	5/30

CL50_{72h} não calculável

TABELA 26. Ensaio bruto de toxicidade aguda com *B.glabrata* exposto 72h ao corante Remazol Alaranjado 3R hidroxietilsulfona

Concentração (mg L ⁻¹)	Mortalidade por Réplica - <i>Biomphalaria glabrata</i>			Total
	1	2	3	
controle	0/10	0/10	0/10	0/30
100	0/10	1/10	0/10	1/30
1000	1/10	0/10	0/10	1/30
2000	1/10	1/10	1/10	3/30
5000	3/10	1/10	2/10	6/30

CL50_{72h} não calculável

TABELA 4. Ensaio bruto de toxicidade crônica com *C. dubia* exposto 7-8d ao corante Remazol Alaranjado 3R sulfatoetilsulfona

		Réplicas									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Controle	Jovens	23	15	14	6	12	22	19	16	25	20
	Ttal										
	Jovens	172	Média = 18,3								
6,25 ppm	Jovens	17	18	16	17	13	24	20	19	16	17
	Ttal										
	Jovens	177	Média = 17,7								
12,5 ppm	Jovens	12	15	15	15	15	20	21	18	19	16
	Ttal										
	Jovens	166	Média= 16,6								
25 ppm	Jovens	17	16	20	19	15	18	13	16	23	25
	Ttal										
	Jovens	182	Média = 18,2								
50 ppm	Jovens	20	13	20	21	18	19	19	13	15	14
	Ttal										
	Jovens	172	Média = 17,2								
75 ppm	Jovens	21	19	21	16	26	20	20	13	17	14
	Ttal										
	Jovens	187	Média = 18,7								
100 ppm	Jovens	20	20	20	18	15	15	15	17	18	16
	Ttal										
	Jovens	174	Média = 17,4								

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABIQUIM/DETEC (Associação Brasileira da Indústria Química/Departamento de Assuntos Técnicos). *Sistema Harmonizado Globalmente para a Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos*. São Paulo, 2005.
2. ABNT NBR 12713, *Ecotoxicologia aquática – toxicidade aguda – método de ensaio com Daphnia spp (Cladocera, Crustacea)*, 2004.
3. ABNT NBR 13373, *Ecotoxicologia aquática – toxicidade crônica – método de ensaio com Ceriodaphnia spp (Cladocera, Crustacea)*, 2005.
4. ABNT NBR 14411:3, *Ecotoxicologia aquática – toxicidade aguda – determinação do efeito inibitório de amostras de água sobre a emissão de luz de Vibrio fischeri (ensaio de bactéria luminescente)*. Parte 3- Método utilizando bactérias liofilizadas, 2006.
5. ALMEIDA, E.; ASSALIN, M.R.; ROSA, M.A.; DURAN, N. Tratamento de efluentes industriais por processos oxidativos de ozônio. *Química Nova*, v.27, 5, p.818-824, 2004.
6. AMORIM, C.C.; LEÃO, M.M.D.; MOREIRA, R.F.P.M. Comparison of various advanced oxidation processes for azo dye degradation. *Eng. Sanit. Ambiental*, v. 14, n. 4, p. 543-550, 2009.
7. ANDERSON, D., BISHOP, J.B., GARNER, C.R., OSTROSKY-WEGMAN, P., SELBY, P.B.; Cyclophosphamide: Review of its mutagenicity for an assessment of potential germ cell risks. *Mutation Research*, v.330, p. 115-181, 1995.
8. ARSLAN-ALATON, I.; GURSOY, B.H.; SCHMIDT, J.-E. Advanced oxidation of acid and reactive dyes: effect of Fenton treatment on aerobic, anoxic and anaerobic processes. *Dyes and Pigments*, v. 78, p. 117–130, 2008.

9. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA QUÍMICA. *Corantes e Pigmentos*. ABIQUIM, 2006. Disponível em: <<http://www.abiquim.org.br>>. Acesso em: 11 de setembro 2011.
10. BLY, J.H. Electron beam processing. *Yardley, Pennsylvania*, 1988.
11. BORRELY, S.I. *Redução da toxicidade aguda de efluentes industriais e domésticos tratados por irradiação com feixes de elétrons, avaliada com as espécies Vibrio fischeri, Daphnia similis e Poecilia reticulata*. 2001. Tese (Doutorado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - CNEN, Universidade de São Paulo.
12. BORRELY, S.I.; DEL MASTRO, N.L.; SAMPA, M.H.O. Improvement of municipal wastewaters by electron beam accelerator in Brazil. *Radiation Physics and Chemistry*, v. 52, n. 1-6, p. 333-337, 1998.
13. BRAILE, P.M. e CAVALCANTI, J.E.W.A. *Manual de Tratamento de Águas Residuárias Industriais*. São Paulo, Cetesb, 1993.
14. BROWN, M.A.; DE VITO, S.C. Predicting azo dye toxicity. *Critical Rev.Environmental Sci. Technol.*, v.23, p.249-324, 1993.
15. BUXTON, G.V., GREENSTOCK, C.L., HELMAN, W.P., ROSS, A.B. Critical review of rate constants for reactions of hydrated electrons, hydrogen atoms and hydroxyl radicals ($\bullet\text{OH}/\bullet\text{O}^-$) in aqueous solution. *J. Phys. Chem. Ref. Data* v. 17, p. 518-886, 1998. Updated version. <http://www.rcdc.nd.edu>.
16. CARNEIRO, P.A., UMBUZEIRO, G.A.; OLIVEIRA, D.P.; ZANONI, M.V.B. Assessment of water contamination caused by a mutagenic textile effluent/dyehouse effluent bearing disperse dyes. *Journal of Hazardous Materials*, v.174, n.1-3, p. 694-699, 2010.

17. CATANHO, M.; MALPASS, G.R.P.; MOTHEO, A.J. Avaliação dos tratamentos eletroquímico e fotoeletroquímico na degradação de corantes têxteis. *Química Nova*, v.29, n. 5, p. 983-989, 2006.
18. ÇICEK, F.; ÖZER, D.; ÖZER, A. ÖZER, A. Low cost removal of reactive dyes using wheat bran. *Journal of Hazardous Materials*, v. 146, p. 408-416, 2007.
19. CLAXTON, L.D.; HOUK, V.S.; HUGUES, T.J. Genotoxicity of industrial waste and effluents. *Mutation Research*, v.410, p.237-243, 1998.
20. COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. Compilação de técnicas de prevenção à poluição para indústria têxtil. *Manuais Ambientais CETESB*, 2001.
21. CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE - Ministério do Meio Ambiente; *Resolução N°357*, 17 de março de 2005.
22. CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE - Ministério do Meio Ambiente; *Resolução N°237*, 19 de dezembro de 1997.
23. COONEY, J.D. *Freshwater tests*. In: RAND,G.M. Fundamental of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate and Risk Assessment. Washington,D.C., Taylor & Francis, 2° Ed., p. 71-102, 1995.
24. COOPER, W.J.; WAITE, T.D.; KURUCZ, C.N; NICKELSEN, M.G.; LIN, K. *High energy electron beam irradiation for the destruction of toxic organic chemicals*. In: *Raditec*, p.385-391, 1996.
25. DIAS, G.F. **Educação Ambiental: princípios e práticas**. São Paulo, 1992.

26. DJAKA, K.; TAKÁCS, E.; SOLPAN, D.; WOJNAROVITS, L.; GÜVEN, O. High-energy irradiation treatment of aqueous solution of C.I. Reactive Black 5 dye: pulse radiolysis experiments. *Radiation Physics and Chemistry*, v.67, p. 535–538, 2003.
27. DONNAPERNA, L.; DUCLAX, L.; GADIOU, R.; HIRN, M.P.; MERLI, C.; PIETRELLI, L. Comparison of adsorption of Remazol Black B and Acidol Red on microporous active carbon felt. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 339, p. 275-284, 2009.
28. DOS SANTOS, A.B.; CERVANTES, F.J.; VAN LIER, J.B. Review paper on current technologies for decolourisation of textile wastewaters: Perspectives for anaerobic biotechnology. *Bioresource Technology*, v. 98, p. 2369-2385, 2007.
29. DOUST, J.L.; SCHMIDT, M.; DOUST, L.L. Biological assessment of aquatic pollution: a review, with emphasis on plants as biomonitors. *Biol.Rev.*, v,69, p.147-186, 1994.
30. DUARTE, C.L. *Aplicação do processo avançado de oxidação por feixe de elétrons na degradação de compostos orgânicos presentes em efluentes industriais*. 1999. Tese (Doutorado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - CNEN, Universidade de São Paulo.
31. DUARTE, C.L.; GERALDO, L.L.; JUNIOR, O.A.P.; BORRELY, S.I.; SATO, I.M.; SAMPA, M.H.O. Treatment of effluents from petroleum production by electron beam irradiation. *Radiation Physics and Chemistry*, v. 71, p. 443-447, 2004.
32. DUARTE, C.L.; M.H.O. SAMPA; RELA, P.R.; OIKAWA, H.; SILVEIRA, C.G.; AZEVEDO, A.L. Advanced oxidation process by electron beam irradiation induced decomposition of pollutants in industrial effluents. *Radiation Physics and Chemistry*, v. 63, p. 647-651, 2002.

33. DUARTE, C.L.; MORI, M.N.; KODAMA, Y.; OIKAWA, H.; SAMPA, M.H.O. Decontamination of pesticide packing using ionizing radiation. *Radiation Physics and Chemistry*, v. 76, p. 1885-1889, 2007.
34. DUARTE, C.L.; SAMPA, M.H.O.; RELA, P.R.; OIKAWA, H.; CHERBAKIAN, E.H.; SENA, H.C.; ABE, H.; SCIANI, V. Application of electron beam irradiation combined to conventional treatment to treat industrial effluents. *Radiation Physics and Chemistry*, v.57, p. 513-518, 2000.
35. DURAN, N.; MORAIS S.G.; FREIRE, R.S. Degradation and toxicity reduction of textile effluent by combined photocatalytic and ozonation process. *Chemosphere*, v.40, p.369-373, 2000.
36. DURATE, C.L.; ANDRADE, D.C.; MELO, R.P.; NAGATOMI, H.R.; NORI, M.N. Decontamination of Ametryne HDPE packaging using electron beam accelerator. *Radiation Physics and Chemistry*, v. 78, p. 725-728, 2009.
37. EPOLITO, W.J.; LEE, Y.H.; BOTTOMLEY, L.A.; PAVLOSTATHIS, S.G. Characterization of the textile anthraquinone dye Reactive Blue 4. *Dyes and Pigments*, v.67, p. 35-46, 2005.
38. FOLDVÁRY, Cs.M.; WOJNÁROVITS, L. The effect of high-energy radiation on aqueous solution of Acid Red 1 textile dye. *Radiation Physics and Chemistry*, v.76, p. 1485-1488, 2007.
39. FREIRE, R.S.; PELEGRINI, R.; KUBOTA, L.T.; DURÁN, N.; ZAMORA, P.P. Novas tendências para o tratamento de resíduos industriais contendo espécies organocloradas. *Química Nova*, v. 23, n.4, p. 504-511, 2000.

40. GEHRINGER, P. Technical and economical aspects of radiation technology for wastewater treatment application in industrial scale. *IAEA, Satatus of industrial scale radiation treatment of wastewater and its future*, 2004.
41. GEORGIU, D.; MELIDIS, P.; ALIVASIDIS, A.; GIMOUHOPOULOS, K. Degradation of azo-reactive dyes by ultraviolet radiation in the presence of hydrogen peroxide. *Dyes and Pigments*, v. 52, p. 69-78, 2002.
42. GETOFF, N. Radiation-induced degradation of water pollutants - State of the art. *Radiat Phys. Chem.*, v. 47, n. 4, p. 581-593, 1996.
43. GOMES, L. Degradação Eletroquímica do corante têxtil Alaranjado Remazol 3R utilizando diferentes eletrodos. 2009. Tese (Doutorado) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo.
44. GOTTLIEB, A.; SHAW, C.; SMITH, A.; WHEATLEY, A.; FORSYTHE, S. The toxicity of textile reactive azo dyes after hydrolysis and decolourisation. *Journal of Biotechnology*, Amsterdam, v. 101, p. 49-56, 2003.
45. GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO - **DECRETO N^o 8648**, 8 de setembro de 1976.
46. GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO - **Lei N^o 997**, 31 de maio de 1976.
47. GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO - Secretaria do Meio Ambiente; **Resolução SMA N^o 3**, 22 de fevereiro de 2000.
48. GÖZMEN, B.; KAYAN, B.; GIZIR, A.M.; HESENOV, A. Oxidative degradations of reactive blue 4 dye by different advanced oxidation methods. *Journal of Hazardous Materials*, v. 168, p. 129-136, 2009.

49. GRAZZAFFE, V.S.; TALLARICO, L.F.; PINHEIRO, A.S.; KAWANO, T.; SUZUKI, M.F.; OKAZAKI, K.; PEREIRA, C.A., NAKANO, E. Establishment of the comet assay in the freshwater snail *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). *Mutation Research*. Jun 30;654(1), p.58-63, 2008.
50. GUARATINI, C.I.; ZANONI, M.A. Corantes Têxteis. *Revista Química Nova*, v.23, p.71-78, 2000.
51. HAMMANI S., OTURAN, N., BELLEKHAL N., DACHRAOUI M., OTURAN M.A. Oxidative degradation of direct orange 61 by electro-Fenton process using a carbon felt electrode: application of the experimental design methodology. *J. Electroanal. Chem.* v. 610, p. 75–84, 2007.
52. HAO, J.O; KIM, H.; CHIANG, P.C. Decolorization of Wastewater. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, v. 30, n. 4, p. 449–505, 2000.
53. HARVEY, B. G. **Introduction to Nuclear Physics and Chemistry**. Englewood Cliffs, N. J.: Prentice-Hall, 1969.
54. HSUEH,C.L.; HUANG, Y.H.; WANG, C.C.; CHEN, C.Y. Degradation of azo dyes using low iron concentration of Fenton and Fenton-like system. *Chemosphere*, v.56, p.1409-1414, 2005.
55. HUSAIN, Q. Potential Applications of the Oxidoreductive Enzymes in the Decolorization and Detoxification of Textile and Other Synthetic Dyes from Polluted Water: A Review. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 26, p. 201–221, 2006.
56. INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. *Radiation Processing: environmental applications*. Vienna, 2007.

57. INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. *Radiation treatment of polluted water and wastewater*. Vienna, 2008.
58. JALOSZYNSKI, P.; KUJAWSKI, M.; CZUB-SWIERCZEK, M.; MARKOWSKA, J.; SZYFTER, K. Belomycin induced DNA damage and its removal in lymphocytes of breast cancer patients studied by comet assay. *Mutation Research*, v. 385, p. 223-233, 1997.
59. KAWANO, T; OKAZAKI, K.; RÉ, L. Embryonic development of *Biomphalaria glabrata* (SAY, 1818) (Mollusca, Gastropoda, Planorbidae): A practical guide to the main stages. *Malacologia*, v.34, n.1-2, p.25-32, 1992.
60. KIM, H.J.; SEO, D.W. Effect of water absorption fatigue on mechanical properties of sisal textile-reinforced composites. *International Journal of Fatigue*, v. 28, p. 1307–1314, 2006.
61. KIM, T.H.; LEE, J.K.; LEE, M.J. Biodegradability enhancement of textile wastewater by electron beam irradiation. *Radiation Physics and Chemistry*, v. 76, p. 1037–1041, 2007.
62. KUNZ, A.; PERALTA-ZAMORA, P.; MORAES, S.G.; DURAN, N. Novas Tendências no Tratamento de Efluentes Têxteis. *Revista Química Nova*, v.25, p.78-82, 2002.
63. KUSVURAN, E., GULNAZ, O., IRMAK, S., ATANUR, O.M., YAVUZ, H.I., ERBATUR, O. Comparison of several advanced oxidation processes for the decolorization of Reactive Red 120 azo dye in aqueous solution. *Journal of Hazardous Materials*, v. 109, p. 85-93, 2004.
64. KUSVURAN, E., IRMAK, S., YAVUZ, H.I., SAMIL, A., ERBATUR, O. Comparison of the treatment methods efficiency for decolorization and mineralization of Reactive Black 5 azo dye. *Journal of Hazardous Materials*, v. 119, p. 109-116, 2005.

65. LAS CASAS, A. *Tratamento de efluentes industriais utilizando a radiação ionizante de acelerador industrial de elétrons e por adsorção com carvão ativado. Estudo comparativo*. 2004. Tese (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - CNEN, Universidade de São Paulo.
66. LEE, J.W.; CHOI, S.P.; THIRUVENKATACHARI, R.; SHIM, W.G., MOON, H. Evaluation of the performance of adsorption and coagulation processes for the maximum removal of reactive dyes. *Dyes and Pigments*, v. 69, n. 3, p. 196-203, 2006.
67. LOPES, C.; CHARLES, S.; VOLLAT, B.; GARRIC, J. Toxicity of Ivermectin on Cladocerans: comparison of toxic effects on Daphnia and Ceriodaphnia species. *Env.Toxic.Chem.*, v.28, p.2160-2166, 2009.
68. LOUREIRO, C.F.B. Educação Ambiental Transformadora. In: LAYRARGUES P.P. (Org.). **Identidades da educação ambiental brasileira**. Brasília:MMA/DEA, 2004.
69. MALACHOVÁ, K.; PAVLÍCKOVÁ, Z.; NOVOTNY, C.; SVOBODOVA K.; LEDNICKA, D.; MUSILKOVÁ, E. Reduction in the Mutagenicity of Synthetic Dyes by Successive Treatment With Activated Sludge and the Ligninolytic Fungus, *Irpex lacteus*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 47, p. 533 – 540, 2006.
70. MERIÇ, S.; KAPTAN, D.; ÖLMEZ, T. Color and COD removal from wastewater containing Reactive Black 5 using Fento's oxidation process. *Chemosphere*, v. 54, n. 3, p. 435-441, 2004.
71. MORAES, M.C.F.; ROMANELLI, M.F.; SENA, H.C.; SILVA, G.P.; SAMPA, M.H.O.; BORRELY, S.I. Whole acute toxicity removal from industrial and domestic effluents treated by electron beam radiation: emphasis on anionic surfactants. *Radiation Physics and Chemistry*, v. 71, p. 461-463, 2004.

72. MOURA, L.A.A. *Economia Ambiental - Gestão de Custos e Investimentos*. Editora Juarez de Oliveira, 3ª Edição, 2006.
73. NAKANO, E., WATANABE, L.C., OHLWEILER, F.P., PEREIRA, C.A.B., KAWANO, T.; Establishment of the dominant lethal test in the freshwater mollusk *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). *Mutation Res.*, v.536, p.145-154, 2003.
74. NILRATNISAKORN, S.; THIRAVETYAN, P.; NAKBANPOTE, W. Synthetic reactive dye wastewater treatment by narrow-leaved cattails (*Typha angustifolia* Linn.): Effects of dye, salinity and metals. *Science of the Total Environmental*, v.384, p. 67-76, 2007.
75. NOVOTNÝ, C.; DIAS, N.; KAPANEN, A.; MALACHOVÁ, K.; VÁNDROVCOVÁ, M.; ITÄVAARA, M.; LIMA, N. Comparative use of bacterial, algal and protozoan tests to toxicity of azo and anthraquinone dyes. *Chemosphere*, v.63, p.1436-1442, 2006.
76. OHE, T., WATANABE, T., WAKABAYASHI, K.; Mutagens in surface waters: a review. *Mutation Research*, v.567, p. 109-149, 2004.
77. OHE, T.; WATANABE, T.; NONOUCHI, Y.; HASEI, T.; AGOU, Y.; TANI, M.; WAKABAYASHI, K. Identification of a new mutagen, 4,4'-diamino-3,3'-dichloro-5-nitrobiphenyl, in river water flowing through an industrial area in Wakayama, Japan. *Mutation Research*, v.655, n,1-2, p. 28-35, 2008.
78. OLIVIERO, L.; BARBIER Jr, J.; DUPREZ D., Wet air oxidation of nitrogen-containing organic compounds and ammonia in aqueous media. *Appl. Catal. B: Environ.* v. 40 p. 163-184, 2003.
79. ONG, S.A; TOORISAKA, E.; HIRATA, M.; HANO, T. Treatment of azo dye Orange II in aerobic-SBR systems. *Process Biochemistry*, v.40, n. 8, p. 2907-2914, 2005.

80. ÓRFÃO, J.J.M.; SILVA, A.I.M.; PEREIRA, J.C.V.; BARATA, S.A.; FONSECA, I.M.; FONSECA, I.M.; FARIA, P.C.C.; PEREIRA, M.F.R. Adsorption of a reactive dye on chemically modified activated carbons-Influence of pH. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 296, n. 2, p. 480-489, 2006.
81. OSUGI, M.E.; UMBUZEIRO, G.A.; DE CASTRO, F.J.V.; ZANONI, M.V.B. Photoelectrocatalytic oxidation of remazol turquoise blue and toxicological assessment of its oxidation products. *Journal of Hazardous Materials*, v. 137, p. 871-877, 2006.
82. PÁLFI, T.; TÁKACS, E.; WOJNARÓVITS, L. Degradation of H-acid and its derivate in aqueous solution by ionising radiation. *Water Research*, v. 41, p. 2533-2540.
83. PAPIĆ, S.; KOPRIVANAC, N.; BOZIC, A.L.; METES, A. Removal of some reactive dyes from synthetic wastewater by combined Al(III) coagulation/carbon adsorption process. *Dyes and Pigments*, v. 62, n. 3, p. 291-298, 2004.
84. PARVEZ, S.; VENKATARAMAN, C.; MUKHERJ, S. A review on advantages of implementing luminescence inhibition test (*Vibrio fischeri*) for acute toxicity prediction of chemicals. *Environmental International*, v. 32, p. 265-268, 2006.
85. PASCHOAL, F.M.M.; TREMILIOSI-FILHO, G. Aplicação da Tecnologia de Eletrofloculação na recuperação do corante Índigo Blue a partir de Efluentes Industriais. *Química Nova*, v. 28, n. 5, p.766-772, 2005.
86. PAUL, J.; RAWAT, K.P.; SARMA, K.S.S; SHABARWAL, S. Decoloration and degradation of Reactive Red 120 dye by electron beam irradiation in aqueous solution. *Applied Radiation and Isotopes*, v. 69, p. 982-987, 2011.

87. PEARCE, C.I.; LLOYD, J.R.; GUTHRIE, J.T. The removal of colour from textile wastewater using whole bacterial cells: a review. *Dyes and Pigments*, v. 58, p. 179-196, 2003.
88. PINHEIRO, H.M.; TOURAUD, E.; THOMAS, O. Aromatic amines from azo dye reduction: status review with emphasis on direct UV spectrophotometric detection in textile industry wastewaters. *Dyes and Pigments*, v. 61, n. 2, p. 121-139, 2004.
89. RAUF, M.A.; ASHRA, S. S. Radiation induced degradation of dyes - An overview. *Journal of Hazardous Materials*. 166(1):6-16, 2009.
90. RELA, P.R. *Desenvolvimento de dispositivo de irradiação para tratamento de efluentes industriais com feixe de elétrons*. 2004. Tese (Doutorado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - CNEN, Universidade de São Paulo.
91. RELA, P.R.; SAMPA, M.H.O.; DUARTE, C.L.; COSTA, F.E.; SCIANI, V. Development of up-flow irradiation device for electron beam wastewater treatment. *Radiation Physics and Chemistry*, v. 57, p. 657-660, 2000.
92. RIZZO, L. Bioassays as a tool for evaluating advanced oxidation processes in water and wastewater treatment. *Water Research*, v. 45, p. 4311-4340, 2011.
93. ROBINSON, T.; McMULLAN, G.; MARCHANT, R.; NIGAM, P. Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Bioresource Technology*, v. 77, p. 247-255, 2001.
94. ROMANELLI, M.F. *Avaliação da toxicidade aguda e crônica dos surfactantes DSS e LAS submetidos à irradiação com feixes de elétrons*. 2004. Tese (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - CNEN, Universidade de São Paulo.

95. ROMANELLI, M.F.; MORAES, M.C.F.; VILLAVICENCIO, A.L.C.H.; BORRELY, S.I. Evaluation of toxicity reduction of sodium dodecyl sulfate submitted to electron beam radiation. *Radiation Physics and Chemistry*, v. 71, p. 409-411, 2004.
96. SADIK, W.A. Effect of inorganic oxidant in photodecolourization of azo dye, *Journal Photochem. Photobiol. A: Chem.* v. 191, p. 132–137, 2007.
97. SAMPA, M.H.O.; BORRELI, S.I.; SILVA, B.L.; VIEIRA, J.M.; RELA, P.R.; CALVO, W.A.P.; NIETO, R.C.; DUARTE, C.L.; PEREZ, H.E.M.; SOMESSARI, E.S.; LUGÃO, A.B. The use of electron beam accelerator for the treatment of drinking water and wastewater in Brazil. *Radiation Physics and Chemistry*, v. 46, n. 4-6, p. 1143-1146, 1995.
98. SAMPA, M.H.O.; DUARTE, C.L.; RELA, P.R.; SOMESSARI, E.S.R.; SILVEIRA, C.G.; AZEVEDO, A.L. Remotion of organic compounds of actual industrial effluents by electron beam irradiation. *Radiation Physics and Chemistry*, v. 52, n. 1-6, p. 365-369, 1998.
99. SATUF, M.L.; PIERRESTEGUI, M.J.; ROSSINI, L.; BRANDI, R.J.; ALFANO, O.M. Kinetic modeling of azo dyes photocatalytic degradation in aqueous TiO₂ suspensions. Toxicity and biodegradability evaluation. *Catalysis Today*, v. 161, n. 1, p. 121-126, 2011.
100. SEGA, G.A.; A review of the genetics effects of ethyl methanesulfonate. *Mutation Res*, v.134, p.113-142, 1984.
101. SOCIETY OF DYES AND COLOURISTS. *Colour Index International*. Disponível em: <<http://www.colour-inex.org>>. Acesso em: 20 de setembro 2011.
102. ŠOSTAR-TURK, S.; SIMONIÈ, M.; PETRINIC, I. Wastewater treatment after reactive printing. *Dyes and Pigments*, v. 64, n. 2, p. 147-152, 2005.

103. STAMBUK, A., PAVLICA, M., MALOVIC, L., KLOBUCAR, G.; Persistence of DNA damage in the freshwater mussel *Unio pictorum* exposure to ethyl methanesulphonate and hydrogen peroxide. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v.49, p. 217-225, 2008.
104. TALLARICO, L.F., OKAZAKI, K., KAWANO, T., PEREIRA, C.A.B., NAKANO, E.; Dominant lethal effect of ^{60}Co gamma radiation in *Biomphalaria glabrata* (SAY,1818). *Mutation Res.*, v.561, p. 139-145, 2004.
105. TANTAK, N.P.; CHAUDHARI, S. Degradation of azo dyes by sequential Fento's oxidation and aerobic treatment. *Journal of Hazardous Materials*, v. 136, n. 3, p. 698-705, 2006.
106. TEXEIRA, C.P.A.B.; JARDIM, W.F. Processos Oxidativos Avançados: Conceitos Teóricos. *Universidade Estadual de Campinas, Laboratório de Química Ambiental*, 2004.
107. TICE, R.R., AGURELL E., ANDERSON, D., BURLINSON, B., HARTMANN, A., KOBAYASHI, H., MIYAMAE, Y., ROJAS, E., RYU, J.C., SAZAKI, Y.F.; Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v.35, p. 206-221, 2000.
108. TIGINI, V.; GIANANTI, P.; MANGIAVILLANO, A.; PANNOCHIA A.; VARESE, G.C. Evaluation of toxicity, genotoxicity and environmental risk of simulated textile and tannery watewaters with a battery of biotests. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, "article in press", 2011.
109. TING, T.M.; JAMALUDIN, N. Decolorization and decomposition of organic pollutants for reactive and disperse dyes using electron beam technology: Effect of the concentrations of pollutants and irradiation dose. *Cheomosphere*, v.73, p. 76-80, 2006.

110. U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. *EPA Office of Compliance Sector Notebook Project: Profile of the Textile Industry*. Sector Notebook Project, 1997. Disponível em: <<http://www.epa.gov>> . Acesso em: 15 de agosto 2011.
111. UMBUZEIRO, G.A.; FREEMAN, H.S.; WARREN, S.H.; OLIVERA, D.P.; YOSHIYASU, T.; WATANABE, T.; CLAXTON, L.D. The contribution of azo dyes to the mutagenic activity of the Cristais River. *Chemosphere*, v. 60, n.1, p. 55-64, 2005.
112. VAHDAT, A.; BAHRAMI, S.H.; ARAMI, M.; MOTOHARI, A. Decomposition and decoloration of a direct dye by electron beam radiation. *Radiation Physics and Chemistry*, v. 79, p. 33–35, 2010.
113. VAJNHANDL, S.; LE MARECHAL, A.M. Ultrasoun in textile dyeing and the decolouration/mineralization of textile dyes. *Dyes and Pigments*, v. 65, n. 2, p. 89-101, 2005.
114. VILLELA, I.V., OLIVEIRA, I.M., SILVA, J., HENRIQUES, J.A.P.; DNA damage and repair in haemolymph cells of golden mussel (*Limnoperna fortunei*) exposed to environmental contaminants. *Mutation Res.*, v.605, p. 78-86, 2006.
115. WANG, C.; YEDILER, A.; LIENERT, D.; WANG, Z.; KETTRUP, A. Ozonation of an azo dye C.I. Remazol Black 5 and toxicological assessment of its oxidation products. *Chemosphere*, v.52, p. 1225-1232, 2003.
116. WANG, M.; YANG, R.; WANG, W.; SHEN, Z.; BIAN, S.; ZHU, Z. Radiation induced decomposition and decoloration of reactive dyes in the presence of H₂O₂. *Radiation Physics and Chemistry*.v. 75, p. 286–291, 2006.
117. WATANABE, T.; OHBA, H.; ASANOMA, M.; HASEI, T.; TAKAMURA, T.; TERAOKA, Y.; SHIOZAWA, T.; HIRAYAMA, T.; WAKABAYASHI, K.; NUKAYA, H. Isolation

- and identificatio of non-chlorited phenylbenzotriazole (non-CIPBTA)-type mutagens in the Ho River in Shizuoka Prefecture, Japan. *Mutation Research*, v.609, p.137-145, 2006.
118. WEBER, E.J.; STURROCK, P.E.; CAMP, S.R. Reactive Dyes in the aquatic environment: a case study of Reactive Blue 19. *USEPA, Environmental Research Brief*, 1990.
119. WOJNÁROVITS, L.; TAKÁCS, E. Irradiation treatment of azo dye containing wastewater: An overview. *Radiation Physics and Chemistry*, v.77, p. 225–244, 2008.
120. WÜRGLER, F.E., KRAMERS, P.G.N.; Environmental effects of genotoxins (ecogenotoxicology). *Mutagenesis*, v.7, p. 321-327, 1992.
121. ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. *Ecotoxicologia Aquática. Princípios e Aplicações*. Editora Rima, 2006.
122. ZAGHBANI, N.; HAFIANE, A.; DHAHBI, M. Separation of methylene blue from aqueous solution by micellar enhanced ultrafiltration. *Separation and Purification Technology*, v. 55, n. 1, p. 117-124, 2007.
123. ZOLLINGER, H *Color chemistry: syntheses, properties, and applications of organic dyes and pigments*, Zurich Ed., 2003.