



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DOS PERCOLADOS DAS COLUNAS DE
CINZA DE CARVÃO E DE SOLOS COM CINZA DE CARVÃO UTILIZANDO
Lactuca sativa e Daphnia similis COMO ORGANISMOS TESTE**

Flávia Junqueira de Castro

**Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do Grau
de Mestre em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear - Materiais**

**Orientadora:
Profa. Dra. Iara Maria Carneiro de Camargo**

**São Paulo
2013**

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DOS PERCOLADOS DAS
COLUNAS DE CINZA DE CARVÃO E DE SOLOS COM CINZA DE
CARVÃO UTILIZANDO *Lactuca sativa* E *Daphnia similis* COMO
ORGANISMOS TESTE**

FLÁVIA JUNQUEIRA DE CASTRO

Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do Grau
de Mestre em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear – Materiais.

Orientadora:

Dra. Iara Maria Carneiro de Camargo

Versão corrigida

Versão original se encontra no IPEN

São Paulo

2013

Dedicatória

*Aos meus pais, Roseli e Luiz Evaldo,
e a minha irmã Fernanda,
por todo amor e paciência.*

Epígrafe

“O futuro dependerá daquilo que fazemos no presente”

Mahatma Gandhi

Agradecimentos

À Nossa Senhora e à Deus por me ajudar a alcançar mais essa conquista.

Ao meu pai e a minha mãe por seus conselhos por me ouvir sempre que precisei, pela paciência, compreensão e confiança, mas de maneira especial por todo amor.

À minha irmã Nanda por ser minha grande amiga sempre.

Ao meu tio Regis e minha tia Selma pelo carinho.

Aos meus amigos Amanda Büttner, Aline Mendonça, Bruna Graber, Bruna Junqueira, Carolina Martinelle, Heleno Castro, Mônica Santiago e Natália Junqueira por me ouvir e incentivar sempre.

À Dra. Iara Maria Carneiro de Camargo pela oportunidade, paciência e orientação.

À FAPESP pelo auxílio financeiro ao projeto.

À CAPES pela bolsa de mestrado.

Ao Dr. Augusto Cesar, Dr. Camilo Seabra, Msc. Fábio Puscesddu, Msc. Fernando Cortez e Dr. Rodrigo Choueri, pelo apoio, atenção, incentivo, amizade e contribuição para realização deste trabalho.

À Sandra R. Mattiolo por sua contribuição para a realização deste trabalho.

À Camila Lange por sua amizade e contribuição para a realização deste trabalho.

À Lucilena Rebelo por todos os bons conselhos, atenção, carinho e amizade.

Às minhas amigas do laboratório de ecotoxicologia do CQMA: Vanessa Lameira, Giovana Gimiliani e Diana Dias que ajudaram muito para a realização deste trabalho.

Aos meus amigos e colegas Carina Pitwak, Douglas Silva, Juliana Ikebe, Juliana Izidoro, Mainara Faustino, Marina Victoretti, Patricia Cunico, Renan Azevedo e Tarcila Bertolini pelo apoio e momentos de descontração.

À Bruna Oliveira por sua amizade e conversas depois de cada aula.

À Gisela Martini por nossas conversas, amizade, apoio e incentivo sempre.

À Caroline Oliveira e à Juliana Silva pela amizade, momentos de descontração, conselhos, incentivos, preocupação, cuidado e carinho.

Aos funcionários do IPEN e do CQMA pela atenção e disponibilidade e à todos que de alguma forma contribuíram para minha formação.

AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DOS PERCOLADOS DAS COLUNAS DE CINZA DE CARVÃO E DE SOLOS COM CINZA DE CARVÃO UTILIZANDO *Lactuca sativa* E *Daphnia similis* COMO ORGANISMOS TESTE

Flávia Junqueira de Castro

RESUMO

As cinzas resultantes da queima de carvão por usinas termelétricas tem sido uma fonte de contaminação constante devido a seu descarte sobre o solo de forma inadequada. Os elementos tóxicos presentes na cinza de carvão quando lixiviados da cinza para o solo podem ficar biodisponíveis e serem absorvidos por plantas, consumidos por animais ou ainda transportados para diversas matrizes ambientais, tais como, águas subterrâneas e águas superficiais. Ensaio de germinação e desenvolvimento das radículas de *Lactuca sativa* e ensaio de toxicidade aguda com *Daphnia similis* foram realizados para avaliar a toxicidade dos percolados de colunas de cinza de carvão e de solo com cinza de carvão. De acordo com os valores obtidos por meio dos ensaios de germinação e desenvolvimento das radículas de *L. sativa* foram observados efeitos tóxicos à germinação das sementes de *L. sativa* nos percolados da coluna de cinza de carvão. Os valores médios de CI₅₀(_{120h}) destes percolados variaram de 27,6 a 90,6% e os valores do índice de germinação (IG) variaram de 6,7 a 40,8. Nos ensaios de toxicidade aguda com os organismos teste *D. similis* também foram observados efeitos tóxicos à mobilidade e/ou sobrevivência dos organismos expostos aos percolados da coluna de cinza de carvão. Os valores obtidos para CE₅₀(_{48h}) nestes percolados variaram de 25,6 a 84,1%. Os percolados das colunas de solo com cinza de carvão não apresentaram toxicidade tanto à *L. sativa* como à *D. similis*. Os resultados obtidos por meio destes ensaios ecotoxicológicos para os percolados das colunas de cinza de carvão e de solo com cinza de carvão indicam que o solo das colunas retiveram as substâncias tóxicas lixiviadas da cinza de carvão, ou seja, os solos utilizados nestas colunas atuaram como filtros.

ECOTOXICOLOGICAL EVALUATION OF LEACHATES FROM COLUMNS OF COAL FLY ASH AND SOIL WITH COAL FLY ASH USING *Lactuca sativa* AND *Daphnia similis* AS TEST ORGANISM

Flávia Junqueira de Castro

ABSTRACT

The coal fly ash of power plants has been a constant source of contamination due to the improperly disposed on the soil. The toxic elements leached from coal fly ash when in contact with soil could become bioavailable and be absorbed by plants, consumed by animals or transported to different environmental matrices, such as groundwater and surface water. Seed germination and root elongation tests with *Lactuca sativa* and acute toxicity tests with *Daphnia similis* were done to evaluate the toxicity of the leachate from coal fly ash and soil with coal fly ash columns. According to the values obtained for the seed germination and root elongation tests were observed toxic effects to seed germination of *L. sativa* for the leachates from coal fly ash column. The mean values of $IC_{50(120h)}$ for these leachates ranged from 27.6 to 90.6% and the germination index values (IG) ranged from 6.7 to 40.8. In the acute toxicity tests with test organisms *D. similis* were also observed toxic effects to mobility and/or survival of organisms exposed to leachates of the coal fly ash column. The values obtained for $EC_{50(48h)}$ for these leachates range from 25.6 to 84.1%. The leachates of soil with coal fly ash columns not presented toxicity to both test organisms, *L. sativa* and *D. similis*. The data obtained by these ecotoxicological tests to the leachates of soil coal fly ash and soil with coal fly ash columns indicate that the soil of the columns have retained the toxic substances leached from the coal fly ash, thus the soils used in these columns have acted as filters.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVO.....	4
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
3.1. SOLOS.....	5
3.2. CINZA DE CARVÃO.....	6
3.3. ELEMENTOS ESSENCIAIS E TÓXICOS.....	10
3.4. ECOTOXICOLOGIA.....	13
3.4.1. <i>Testes de toxicidade.....</i>	<i>16</i>
3.4.2. <i>Organismos teste.....</i>	<i>17</i>
3.4.3. <i>Ensaio de germinação e desenvolvimento das radículas com Lactuca sativa.....</i>	<i>20</i>
3.4.4. <i>Ensaio de toxicidade aguda com Daphnia similis.....</i>	<i>22</i>
3.5. ESTUDOS ECOTOXICOLÓGICOS PARA AVALIAÇÃO DE ELEMENTOS TÓXICOS	23
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
4.1. OBTENÇÃO DOS PERCOLADOS DAS COLUNAS DE CINZA DE CARVÃO E DE SOLO COM CINZA DE CARVÃO.....	28
4.2. ENSAIO DE GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DAS RADÍCULAS DE LACTUCA SATIVA.....	31
4.3. ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA COM DAPHNIA SIMILIS.....	34
4.4. TRATAMENTOS ESTATÍSTICOS.....	36
4.4.1. <i>Ensaio preliminar.....</i>	<i>36</i>
4.4.2. <i>Ensaio definitivo.....</i>	<i>38</i>
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
5.1. ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS.....	41
5.1.1. <i>Ensaios de germinação e desenvolvimento das radículas de L. sativa 41</i>	
5.1.1.1. <i>Ensaios preliminares.....</i>	<i>42</i>
5.1.1.2. <i>Ensaios definitivos.....</i>	<i>43</i>
5.1.1.3. <i>Desenvolvimento das radículas de Lactuca sativa.....</i>	<i>49</i>
5.1.2. <i>Ensaios de toxicidade aguda com Daphnia similis.....</i>	<i>59</i>
5.1.2.1. <i>Ensaios preliminares.....</i>	<i>59</i>
5.1.2.2. <i>Ensaios definitivos.....</i>	<i>61</i>
5.2. COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO ENTRE OS VALORES OBTIDOS PARA CI50_(120H) E CE50_(48H) E OS PARÂMETROS QUÍMICOS DOS PERCOLADOS DA COLUNA DE CINZA DE CARVÃO.....	63
6. CONCLUSÕES.....	70
APÊNDICES.....	72

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Produção máxima de cinza de carvão nas usinas termelétricas brasileiras em toneladas por ano	8
TABELA 2 - Concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$) média dos elementos presentes na cinza leve das usinas termelétricas brasileiras	10
TABELA 3 – Toxicidade e funções biológicas de elementos importantes	12
TABELA 4 – Organismos teste, efeito e espécie utilizados em testes de toxicidade no Brasil	19
TABELA 5 – Indicação de ensaios de toxicidade e organismos teste para diferentes tipos de amostras	19
TABELA 6 – Condições gerais utilizadas no ensaio de germinação e desenvolvimento da <i>L. sativa</i> e critérios de aceitabilidade	32
TABELA 7 – Condições gerais do ensaio de toxicidade aguda com <i>D. similis</i> e critérios de aceitabilidade	34
TABELA 8 – Toxicidade dos percolados C, SCC e SPC (concentração 100%) obtida nos ensaios preliminares, utilizando como organismos teste <i>L. sativa</i>	42
TABELA 9 - Média do comprimento das radículas das sementes germinadas nos percolados C, SPC e SCC e na água deionizada obtida nos ensaios preliminares	50
TABELA 10 - Média do comprimento das radículas das sementes germinadas nos percolados 28, 56 e 84 da coluna de cinza de carvão e na água deionizada obtida nos ensaios definitivos.....	58
TABELA 11 – Toxicidade dos percolados C, SCC e SPC (concentração 100%) obtida nos ensaios preliminares utilizando como organismos teste <i>D. similis</i>	60
TABELA 12 – Coeficiente de correlação (r) entre $\text{CI}_{50(120\text{h})}$ e $\text{CE}_{50(48\text{h})}$ e os parâmetros químicos dos percolados da coluna de cinza de carvão	64

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – GERAÇÃO DE CINZAS DE CARVÃO DE UMA USINA TERMELÉTRICA E TRANSPORTE DE LIXIVIADOS E PARTICULADOS DA CINZA PARA MATRIZES AMBIENTAIS	8
FIGURA 2 – (A) USINA TERMELÉTRICA DE FIGUEIRA, PARANÁ; (B) DEPÓSITO DE CINZAS DE CARVÃO AO REDOR DA USINA DE FIGUEIRA	9
FIGURA 3 – CONCEITO DE ECOTOXICOLOGIA	14
FIGURA 4 - ETAPAS COMPREENDIDAS NA ECOTOXICOLOGIA DENOMINADA DE CADEIA DA CASUALIDADE	15
FIGURA 5 – EXEMPLO DE UMA CADEIA ALIMENTAR DE UM ECOSSISTEMA AQUÁTICO CONSTITUÍDO POR TRÊS NÍVEIS TRÓFICOS (NT)	18
FIGURA 6 – SEMENTE GERMINADA DE <i>L. SATIVA</i> COM SUA RADÍCULA DESENVOLVIDA	21
FIGURA 7 – <i>DAPHNIA SIMILIS</i>	22
FIGURA 8 - (A) ESQUEMA EXPERIMENTAL DO SISTEMA DE PERCOLAÇÃO DA COLUNA DE SOLO COM CINZA DE CARVÃO; (B) FOTO DO SISTEMA DE PERCOLAÇÃO DAS COLUNAS DE SOLO FRANCO ARENOSO COM CINZA DE CARVÃO.....	30
FIGURA 9 – PERCOLADOS C, SPC E SCC GERADOS AO LONGO DE 336 DIAS	31
FIGURA 10 – FOTOS DO ENSAIO DE GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DAS RADÍCULAS DE <i>L. SATIVA</i>	33
FIGURA 11 – FOTOS DO ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA COM <i>D. SIMILIS</i>	35
FIGURA 12 – FLUXOGRAMA PARA ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS DO ENSAIO PRELIMINAR COM UMA ÚNICA CONCENTRAÇÃO E O CONTROLE NEGATIVO.....	37
FIGURA 13 – FLUXOGRAMA PARA ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS DO COMPRIMENTO DAS RADÍCULAS DAS AMOSTRAS DOS PERCOLADOS E DO CONTROLE NEGATIVO	38
FIGURA 14 – FLUXOGRAMA PARA ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS DOS EFEITOS SUBLETAIS PARA O CRESCIMENTO DAS RADÍCULAS DE <i>L. SATIVA</i>	39
FIGURA 15 – $CI_{50(120H)}$ DOS PERCOLADOS DA COLUNA DE CINZA DE CARVÃO EMPREGANDO COMO ORGANISMO TESTE SEMENTES DE <i>L. SATIVA</i> ─: INTERVALO DE CONFIANÇA.....	44
FIGURA 16 - ÍNDICE DE GEMINAÇÃO (IG) DO PERCOLADO 28 DA COLUNA DE CINZA DE CARVÃO	46
FIGURA 17 - ÍNDICE DE GEMINAÇÃO (IG) DO PERCOLADO 56 DA COLUNA DE CINZA DE CARVÃO	47

FIGURA 18 - ÍNDICE DE GEMINAÇÃO (IG) DO PERCOLADO 84 DA COLUNA DE CINZA DE CARVÃO	48
FIGURA 19 – CONCENTRAÇÃO DOS ELEMENTOS MAJORITÁRIOS NOS PERCOLADOS SCC E SPC	52
FIGURA 20 – CONCENTRAÇÃO DOS ELEMENTOS AS E ZN NOS PERCOLADOS SCC E SPC	54
FIGURA 21 – CONCENTRAÇÃO DOS ÂNIONS NOS PERCOLADOS SCC E SPC	55
FIGURA 22 – CONCENTRAÇÃO DE CARBONO ORGÂNICO, CARBONO INORGÂNICO E CARBONO TOTAL NOS PERCOLADOS SCC E SPC.....	56
FIGURA 23 - PH DOS PERCOLADOS SPC E SCC.....	57
FIGURA 24 - CE50 _(48H) DOS PERCOLADOS DA COLUNA DE CINZA DE CARVÃO UTILIZANDO COMO ORGANISMOS TESTE <i>D. SIMILIS</i> ─: INTERVALO DE CONFIANÇA	61
FIGURA 25 – CONCENTRAÇÃO DOS ELEMENTOS AS, ZN, CD E MO NO PERCOLADO C63	
FIGURA 26 – CONCENTRAÇÃO DOS ELEMENTOS NA, CA, K E MG NO PERCOLADO C. 65	
FIGURA 27 – CONCENTRAÇÃO DOS ÂNIONS NO PERCOLADO C	66
FIGURA 28 - PH DO PERCOLADO C	67
FIGURA 29 - CONCENTRAÇÃO DE CARBONO ORGÂNICO, CARBONO INORGÂNICO E CARBONO TOTAL NO PERCOLADO C	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABMC - Associação Brasileira do Carvão Mineral

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas

AIE - Agência Internacional de Energia

ANEEL - Agência Nacional de Energia Elétrica

ASTM - American Society for Testing and Materials

CENO – Concentração de efeito não observado

CEO – Concentração de efeito observado

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo

CE50_(48h) - Concentração efetiva de mortalidade e/ou imobilidade a 50% dos organismos teste

CI50_(120h) – Concentração de inibição em 50% dos organismos teste

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

CQMA – Centro de Química e Meio Ambiente

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

ICSU - Committe of the International Council of Scientific Unions

IG – Índice de Germinação

IPEN/CNEN- SP – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares / Comissão Nacional de Energia Nuclear – São Paulo

ISO - International Organization for Standardization

MME - Matriz Energética Nacional 2030

OECD - Organization for Economic Cooperation and Development

US EPA – United States Environmental Protection Agency

1. INTRODUÇÃO

O carvão mineral, mesmo com a crescente utilização das fontes de energia renováveis e das matrizes energéticas não renováveis, ainda nos dias de hoje é responsável por grande parte da eletricidade utilizada em todo o mundo. A utilização das usinas termelétricas a base de carvão mineral tem sido cada vez maior com o aumento da demanda energética mundial especialmente em países em desenvolvimento, como Índia e China. De acordo com a Agência Internacional de Energia estima-se que em dez anos esta será a principal fonte de energia elétrica do mundo (AIE, 2011; AIE, 2012).

Atualmente, ainda que grande parte da demanda energética no Brasil seja proveniente de usinas hidrelétricas (65,29%), as usinas termelétricas a base de carvão são responsáveis por 1,52% da eletricidade utilizada no país, cerca de 1.944.052 kW de potência (ANEEL, 2011). Apesar das usinas termelétricas apresentarem uma representatividade na produção energética do país relativamente baixa, só no ano de 2011 foi produzido um total de 12.067.652 toneladas de cinzas de carvão e deste total menos de 50% foi reaproveitado (ABMC, 2011).

Estas cinzas de carvão geradas por usinas termelétricas são classificadas como resíduos sólidos e de um modo geral, são descartadas diretamente sobre o solo a céu aberto, apresentando um potencial para causar danos ao meio ambiente (Gaivizzo et al., 2002; Rohde et al., 2006).

As cinzas de carvão são compostas basicamente por Si, Al, Fe, P, Ca, Mg, Ti, Na K e S em menores quantidades por Ag, As, Au, B, Ba, Be, Cd, Ce, Co, Cr, Cu, Ga, Ge, Li, Mn, Mo, Nb, Ni, Pb, Pt, Rb, Sb, Se, Sr, Ti, U, V, Y, Zn e Zr (Rohde, 2006; Depoi et al., 2008). Os elementos presentes nas cinzas de carvão quando lixiviados para o solo podem ficar ambientalmente disponíveis e vir a ser absorvidos por plantas, consumidos por animais, ou ainda transportados para diferentes matrizes ambientais, tais como, águas superficiais e águas subterrâneas (Lu et al., 2009).

Alguns elementos tóxicos como Cd e Pb apresentam potencial para se bioacumular e/ou biomagnificar em organismos aquáticos, podendo subsequentemente serem consumidos por organismos de níveis tróficos maiores, incluindo o homem (Adams et al., 2002).

Diante da possível contaminação de diferentes matrizes ambientais devido ao descarte inadequado das cinzas de carvão que apresentam toxicidade potencial a diferentes organismos, a utilização de testes de toxicidade se torna uma ferramenta importante. Estes testes são realizados em laboratório sob condições experimentais específicas e controladas, nos quais são determinadas as concentrações e os potenciais efeitos tóxicos que o resíduo analisado pode causar sobre os organismos teste (Costa et al., 2008).

Os ensaios de toxicidade com sementes de plantas são bioensaios nos quais sementes são imersas em uma ou mais substâncias potencialmente tóxicas durante o período inicial de sua germinação, quando estas substâncias podem ser absorvidas e acumuladas no tecido vegetal (Chang et al., 1992; Sobrero et al., 2004).

Estes ensaios são relativamente simples de baixo custo e vêm sendo empregados em estudos realizados em países como Canadá, França, Alemanha, Espanha, Holanda, entre outros, para avaliar os efeitos tóxicos causados por substâncias diversas, mas especialmente por elementos tóxicos devido à sensibilidade que estes organismos teste apresentam (Wong et al., 1982; Cook et al., 2002; Rooney et al., 2007; Chapman et al., 2010).

Estes ensaios apresentam ainda como vantagem a avaliação de amostras líquidas sem necessidade de uma filtração prévia, permitindo que se realizem análises de amostras turvas (Sobrero et al., 2004).

A espécie *Lactuca sativa* (Asterales Lactuca) vem sendo empregada como organismo teste em ensaios de germinação e desenvolvimento das radículas especialmente para avaliar amostras de solo e

água, devido ao fato desta espécie apresentar respostas rápidas a danos ambientais (Cook et al., 2002; Ferreira, 2007; Chapman et al., 2010).

Avaliações ecotoxicológicas realizadas no Brasil têm empregado o microcrustáceo *Daphnia similis* (Cladocera, Crustacea) em testes de toxicidade aguda, uma vez que este organismo é sensível a diferentes contaminantes, além de ser uma espécie de fácil cultivo e manutenção em laboratório (Domingues et al., 2008; Costa et al., 2008; Rodgher et al., 2010).

Estudos ecotoxicológicos relacionados com avaliação da toxicidade de lixiviados de solos contaminados com metais tóxicos e hidrocarbonetos (Cook et al., 2002; Chapman et al., 2010) e de solos e lixiviados de solos com cinza de carvão (Martens et al., 1976; Adriano et al., 1980), utilizando como organismos teste sementes de hortaliças e crustáceos, têm sido realizados.

No Brasil poucos trabalhos relacionados com a avaliação da toxicidade da cinza de carvão têm sido publicados. Printes et al. (2000) avaliaram a toxicidade aguda e crônica de águas superficiais e sedimentos contaminados com cinza de carvão da região Carbonífera do Baixo Jacuí, Rio Grande do Sul, empregando organismos aquáticos.

A avaliação da toxicidade de lixiviados de cinzas de carvão e de solos com cinza de carvão é importante, pois pode fornecer indicações sobre o risco ambiental que os contaminantes presentes nas cinzas de carvão representam a biota de diferentes ecossistemas. De acordo com El Mogazi et al. (1988) é importante avaliar a toxicidade potencial de lixiviados da cinza de carvão nas plantas, uma vez que, estes organismos podem ter seu desenvolvimento alterado devido ao aumento dos elementos provenientes deste resíduo descartado inadequadamente no solo.

2. OBJETIVO

Avaliar a toxicidade dos percolados das colunas de cinza de carvão e de solos com cinza de carvão utilizando a *Lactuca sativa* e a *Daphnia similis* como organismos teste.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Solos

Importantes matrizes ambientais como as águas superficiais e subterrâneas dependem diretamente da qualidade do solo para manter suas propriedades naturais, uma vez que o solo tem influência direta sobre os principais fluxos de água entre a hidrosfera, litosfera, biosfera e atmosfera (Lepsch, 2002).

O solo representa a parte superficial da crosta terrestre, tendo sido formado ao longo dos anos, por meio do intemperismo de rochas derivado de fenômenos biológicos, geológicos, hidrológicos, climáticos e da decomposição da matéria orgânica (Sposito, 1989; Mazoyer et al., 2010).

O solo é dividido em fases líquida (água), gasosa (ar) e sólida. A fase sólida é composta por substâncias minerais, pequenos fragmentos de rochas e de minerais, matéria orgânica proveniente da decomposição de vegetais e de animais (Brady, 1989).

Os grãos do solo podem ser distribuídos quanto ao diâmetro em frações de areia (0,06 - 2,0 mm), silte (0,002 – 0,06 mm), argila (< 0,002mm) e cascalho (> 2,0 mm) (Brady, 1989).

A textura do solo pode ser classificada com base nos teores de areia, silte e argila presentes no solo. Os solos podem ser agrupados de forma simplificada em três classes de textura: solos de textura arenosa, que tem teores de areia superiores a 70%, sendo solos mais permeáveis; solos de textura média apresenta certo equilíbrio entre os teores de areia, silte e argila, que apresentam boa drenagem e capacidade de retenção de água; solos de textura argilosa que tem teores de argila superiores a 35%, estes solos tem baixa permeabilidade (EMBRAPA, 2006).

A textura do solo é propriedade física deste meio que menos sofre alterações ao longo do tempo, e tem grande relevância ecológica devido a sua influência direta sobre o fluxo hídrico no solo, de modo que alterações em suas propriedades podem ser responsáveis pela poluição de matrizes aquáticas causando danos aos organismos aquáticos, podendo também resultar na alteração da biota do solo, como a má formação de raízes (EMBRAPA, 2006).

Os principais elementos presentes no solo são fósforo, sódio, alumínio, potássio, cálcio, magnésio, enxofre, cobalto, zinco, níquel, molibdênio, cobre, ferro, manganês, boro e sílica, de acordo com Lepesch (2002). Grande parte destes elementos presentes naturalmente no solo são elementos essenciais ao desenvolvimento da biota, entretanto, em concentrações elevadas estes elementos apresentam potencial para causar efeitos adversos sobre os organismos que habitam esta matriz (McBride, 1994).

Atividades humanas que envolvem a utilização do solo como aterro sanitário, áreas de descarte de resíduos e mineração têm causado o aumento da concentração de elementos tóxicos no solo e na solução do solo. A toxicidade do solo e da solução do solo pode depender das propriedades das matrizes e dos elementos nestes presentes (Mozeto et al., 2008; Cirino, 2009).

3.2. Cinza de carvão

O carvão mineral ainda tem sido um dos combustíveis fósseis mais utilizados na geração de energia elétrica em todo mundo, apesar de ser potencialmente poluente. Atualmente, a combustão do carvão mineral por usinas termelétricas é responsável por suprir aproximadamente 40% da demanda energética mundial (World Energy Council, 2007; ANEEL, 2011). Segundo a Agência Internacional de Energia (2012) em dez anos o carvão mineral deverá ser a principal fonte de produção energética do mundo.

De acordo com a Agência Nacional de Energia Elétrica (ANEEL, 2011), diversos países dentre eles os Estados Unidos, China, Índia, Alemanha,

Japão e África do Sul, tem no carvão mineral sua principal fonte de geração de energia, e devido a grande disponibilidade deste recurso, somados à necessidade de expansão dos sistemas elétricos e a restrição de outras fontes energéticas, as usinas termelétricas continuarão sendo uma das principais fontes de geração de energia no mundo.

O Brasil tem a décima maior reserva de carvão mineral do mundo (32 bilhões de toneladas). Esta reserva de carvão se encontra distribuída entre os estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, onde estão localizadas as principais usinas termelétricas brasileiras (Izidoro, 2008).

No Brasil, a combustão do carvão mineral por usinas termelétricas tem sido pouco explorada representando apenas 1,5% da matriz energética do país, sendo a maior parte da demanda energética do país suprida por meio de usinas hidroelétricas. Entretanto, frente à necessidade de diversificar a matriz energética do país a expansão das usinas termelétricas está entre as soluções estipuladas pelo governo no plano Matriz Energética Nacional 2030 (MME, 2007; ANEEL, 2011).

Para gerar energia elétrica o carvão passa por um processo de combustão nas usinas termelétricas e durante esse processo são produzidos resíduos sólidos tais como cinzas de fundo (cinzas pesadas) e volantes (cinzas leves). As cinzas de fundo são depositadas na base dos fornos da usina e as cinzas volantes são arrastadas pelos gases de combustão sendo boa parte retida por filtros (Rohde et al., 2006).

Parte da cinza de carvão gerada na etapa final do processo de produção de energia é descartada sobre o solo a céu aberto devido à ausência de uma destinação final adequada para as cinzas de carvão (Prochnow et al., 2000). Na FIG.1 foi mostrado o depósito de cinzas de carvão sobre o solo de forma inadequada, no qual os particulados da cinza podem ser transportados para a atmosfera e água superficial e os lixiviados da cinza para o solo e água subterrânea podendo contaminar estas matrizes ambientais.

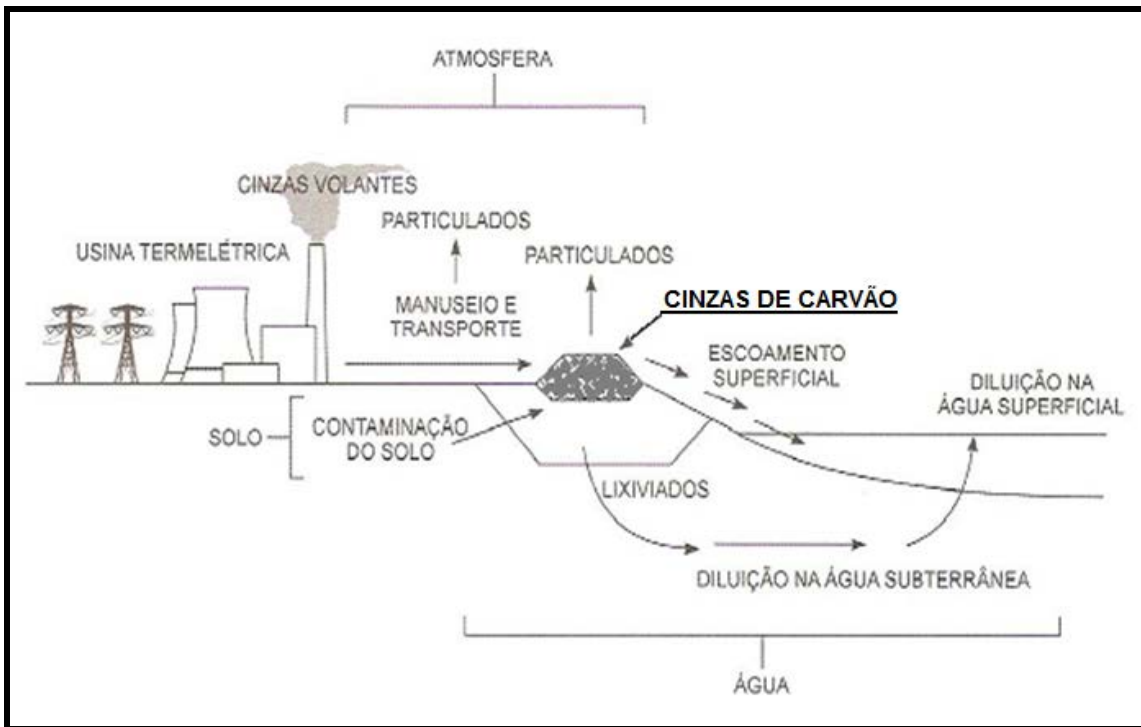


FIGURA 1 – Geração de cinzas de carvão de uma usina termelétrica e transporte de lixiviados e particulados da cinza para matrizes ambientais

Fonte: adaptado de Rohde et al., 2006.

Estima-se que no Brasil são geradas anualmente por usinas termelétricas e outras unidades industriais cerca de quatro milhões de toneladas de cinzas de carvão, das quais aproximadamente apenas 50% são reaproveitadas como, por exemplo, na fabricação de cimentos e concretos Portland (Rohde et al., 2006). Na TAB.1 foi apresentada a produção anual de cinza de carvão das usinas termelétricas brasileiras.

TABELA 1 - Produção máxima de cinza de carvão nas usinas termelétricas brasileiras em toneladas por ano

Usina termelétrica	Resíduos sólidos (t)		
	Cinza volante	Cinza pesada	Escória
Presidente Médici A/B	1.500.000	375.000	-
São Jerônimo	5.000	-	50.000
Charqueadas	295.058	126.453	-
Jorge Lacerda I, II, III e IV	1.500.000	500.000	-
Figueira	50.000	5.000	-

Fonte: Rohde et al., 2006.

Estas cinzas de carvão geradas por usinas termelétricas são classificadas como resíduos sólidos que apresentam toxicidade e propriedades químicas capazes de causar danos ao meio ambiente. De acordo com a Constituição Federal do Brasil (1988), é de responsabilidade do gerador garantir o armazenamento, manuseio, bem como o transporte e a destinação final adequada, uma vez que estes resíduos devem ser descartados em aterros sanitários (Rohde et al., 2006).

Na FIG.2 foram apresentadas fotos da usina termelétrica de Figueira, Paraná, e o depósito de cinzas de carvão na proximidade da usina.



(a)

(b)

FIGURA 2 – (a) Usina termelétrica de Figueira, Paraná; (b) Depósito de cinzas de carvão ao redor da usina de Figueira

Fonte:(a) Carbonífera do Cambuí 2008; (b) Izidoro et al.,2008

A combustão do carvão para geração de energia elétrica tem sido considerada como uma das fontes mais poluidoras uma vez que todo o processo de produção de energia tem potencial para causar danos a diversas matrizes ambientais devido à presença de elementos tóxicos como As, Cd, Co, Cr, Cu, Mo e Pb no carvão e nas cinzas de carvão (Rohde et al., 2006; Depoi et al., 2008).

De acordo com Depoi (2008), as cinzas volantes geradas pela usina termelétrica de Figueira (FIG. 2) que fica localizada no Estado do Paraná, é a

que apresenta as maiores concentrações de alguns elementos tóxicos tais como, arsênio, chumbo, zinco, cádmio, molibdênio quando comparada as demais usinas termelétricas brasileiras. Na TAB.2 foram apresentados os valores médios de concentração dos elementos presentes na cinza leve das usinas termelétricas brasileiras, obtidos no estudo realizado por Depoi (2008).

TABELA 2 - Concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$) média dos elementos presentes na cinza leve das usinas termelétricas brasileiras

Termelétrica	Pb	As	Au	Ba	Be	Cd	Co	Cr	Cu	Zn	Ge	Mn	Mo
Figueira	3477	1820	0,08	660	6,67	16,4	18,1	111	52,6	2224	68,7	305	385
Candiota	26,2	11,9	0,09	372	3,27	0,55	13,9	41,8	20,7	83,6	3,78	294	3,93
Charqueadas	57,3	35,6	0,14	296	6,58	0,77	12,6	82,1	29,1	134	33,8	66,1	4,95
Capivari de baixo	52,5	44,9	0,09	430	2,83	1,29	9,00	84,1	28,1	213	17,6	141	5,86

Fonte - Depoi (2008)

3.3. Elementos essenciais e tóxicos

Elementos como Co, Cu, Se, Zn, que ocorrem naturalmente em diversas matrizes ambientais, em baixas concentrações são essenciais para o metabolismo de plantas e animais, associados com processos respiratórios, formação de proteínas, ativadores de complexos enzimáticos. Porém em altas concentrações esses elementos e outros tais como As, Cd, Cr, Hg, Pb podem se tornar tóxicos e prejudiciais podendo interferir na ação das enzimas em plantas, organismos aquáticos e seres humanos (Ward, 1995; Fairbrother et al, 2007a; Mozeto et al., 2008).

A toxicidade dos elementos pode variar de acordo com diversos fatores, como as características dos organismos e a via de exposição dos elementos (por ingestão, absorção, inalação), o tipo e forma que os elementos se encontram (Water Quality Committee, 2010). Quando os elementos se encontram em matrizes aquáticas, tais como águas superficiais, águas subterrâneas, águas intersticiais, percolados, podem se apresentar em diversas formas de distribuição como: íons livres e dissolvidos; complexados, pela matéria orgânica dissolvida; complexos solúveis com a fração de lipídeos

presentes na água; sorvidos por partículas coloidais e por particulados orgânicos e inorgânicos suspensos na água insolúvel como sulfetos e carbonatos. As diversas formas irão influenciar diretamente na maior ou menor biodisponibilidade dos elementos e conseqüentemente em maior ou menor toxicidade aos organismos (Mozeto et al., 2008).

De forma geral, quando os elementos se encontram em formas de íons livres são considerados mais biodisponíveis e, portanto, a forma que apresenta maior potencial tóxico (Water Quality Committee, 2010).

A forma iônica que os elementos se encontram no meio ambiente influencia diretamente em sua absorção por plantas e micro-organismos. Os nutrientes minerais (micronutrientes e macronutrientes), que são indispensáveis para o ciclo de vida dos vegetais, são absorvidos na forma iônica K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Mo^{6+} , Ni^{2+} . Entretanto, se estes mesmos íons forem absorvidos em excesso podem causar toxicidade para as plantas (Furlani et al., 2004).

Do mesmo modo como ocorrem com os vegetais, estes elementos quando absorvidos em concentrações acima das toleradas por organismos de diferentes espécies podem causar toxicidade aguda, alterações nos processos metabólicos e mudanças fisiológicas, resultando em danos em longo prazo aos organismos, devido ao potencial que esses elementos apresentam de se bioacumular e/ou biomagnificar nos níveis tróficos (Fairbrother et al., 2007b).

O mecanismo da ação tóxica e o metabolismo destes elementos tóxicos em geral são diferentes em plantas e animais, uma vez que estes podem causar impactos sobre tecidos específicos em cada espécie. Muitas vezes, a toxicidade destes elementos ocorre por meio de processos bioquímicos envolvendo componentes celulares, tais como membranas e organelas celulares (Fairbrother et al., 2007b).

A toxicidade e as funções biológicas dos elementos importantes para plantas e mamíferos foram apresentadas na TAB.3.

TABELA 3 – Toxicidade e funções biológicas de elementos importantes

Elemento	Função Biológica	Fitotoxicidade (*) (**)	Toxicidade a mamíferos (*)
Ag	Não conhecida	A (5-10)	A
Al	Pode ativar a desidrogenase succínica	M (50-200)	B
As	Constitui fosfolipídios em algas	M A (5-20)	A
B	Essencial às plantas, constitui o fosfocluconato	M (50-200)	B
Ba	Não conhecida	B (500)	A (formas solúveis)
Be	Não conhecida	M A (10-50)	A
Cd	Não conhecida	M A (5-30)	A
Co	Essencial para mamíferos, cofator de várias enzimas. Em plantas, atua na fixação simbiótica do N ₂	M A (15-50)	M
Cr	Envolvido no metabolismo de açúcares em mamíferos	M A (5-30)	A (Cr ⁶⁺) (Cr ³⁺)
Cu	Essencial a todos os organismos, atua no transporte de O ₂ e como cofator de enzimas redox	M A (20-100)	M
F	Fortalece os dentes em mamíferos	B M (50-500)	M
Fe	Essencial a todos os organismos, cofator de várias enzimas	B (>1000)	B
Hg	Não conhecida	H (1-3)	A (formas solúveis)
Mn	Essencial a todos os organismos, cofator de várias enzimas, e em plantas atua na divisão da molécula de H ₂ O no processo de fotossíntese	B M (300-500)	M
Mo	Essencial a todos os organismos, cofator enzimático na fixação do N ₂ e na redução de NO ₃ ⁻	M (10-50)	M
Ni	Essencial as plantas, e não tem a função conhecida em mamíferos	M A (10-100)	M
Pb	Não conhecida	M (30-300)	A
Sb	Não conhecida	M (150)	A
Se	Essencial a todos os mamíferos e a algumas plantas	M A (5-30)	A
Tl	Não conhecida	M A (20)	A
V	Essencial as algas verdes	A (5-10)	A
Zn	Essencial a todos os organismos, cofator de várias enzimas	B M (100-400)	B M

* As letras classificam a toxicidades como: B (baixa), M (média) e A (alta)

** Os números entre parênteses demonstram a toxicidade no tecido foliar em µg g⁻¹ de peso seco ou ppm

Fonte: McBride, 1994.

É importante ressaltar que além dos efeitos de bioacumulação e biomagnificação, a presença de mais de um elemento em uma mesma matriz pode causar efeitos sinérgicos, ou seja, quando a presença de um elemento pode resultar no aumento da absorção de outro (Faquin, 1997; Aragão et al., 2008).

3.4. Ecotoxicologia

A ecotoxicologia é a ciência que avalia os efeitos de substâncias tóxicas sobre os ecossistemas, resultantes do descarte de substâncias químicas e de resíduos em matrizes ambientais. Esta ciência tem como objetivo proteger ecossistemas inteiros e prever futuros impactos (Hoffman et al., 2002).

O termo Ecotoxicologia foi sugerido pela primeira vez durante uma reunião do Committee of the International Council of Scientific Unions (ICSU), realizada em Estocolmo, pelo toxicologista francês René Truhaut no ano de 1969. O termo ecotoxicologia foi definido após uma série de reuniões como sendo *“a ciência que estuda os efeitos das substâncias naturais ou sintéticas sobre os organismos vivos, populações e comunidades, animais ou vegetais, terrestres ou aquáticos, que constituem a biosfera, incluindo assim a interação das substâncias com o meio nos quais os organismos vivem num contexto interligado”* (FIG. 3) (Plaa, 1982).

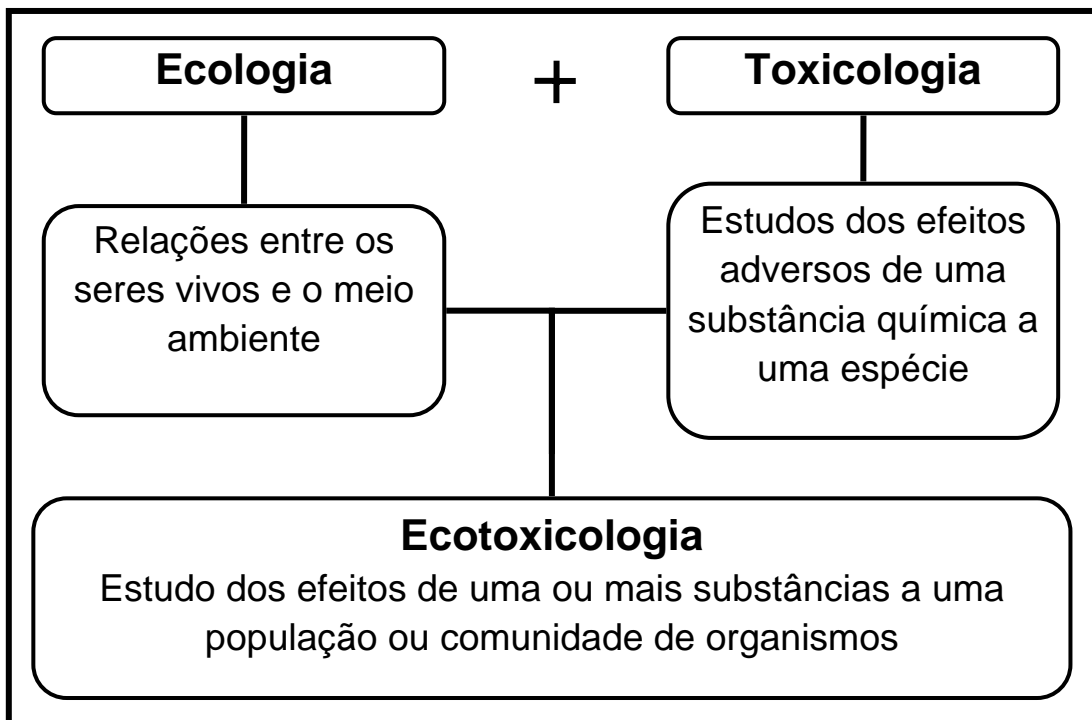


FIGURA 3 – Conceito de Ecotoxicologia

Fonte: adaptado de Blaise, 1984

Um dos desafios da Ecotoxicologia é identificar potenciais fontes de contaminantes no meio ambiente, bem como conhecer as possíveis interações, transformações e destino que estes contaminantes podem ter no ambiente para realizar uma predição segura dos efeitos tóxicos que estes contaminantes podem causar a diferentes ecossistemas (Hoffman et al., 2002; Zagatto et al., 2008). Além disto, é importante ter conhecimento dos riscos potenciais a que a exposição a estes poluentes oferece a biota. Na FIG.4 foram apresentadas as etapas compreendidas na ecotoxicologia denominada de cadeia da casualidade de acordo com Costa et al.(2008).

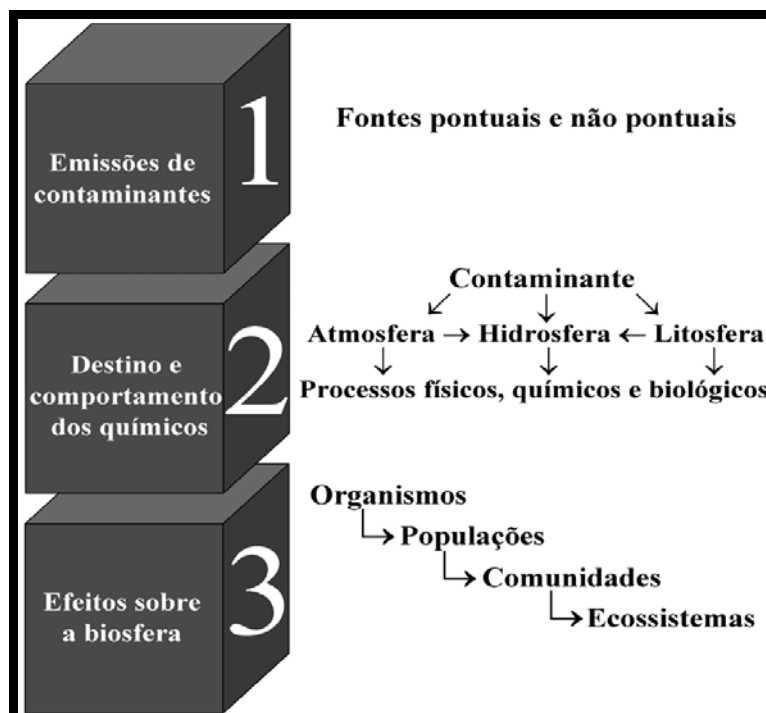


FIGURA 4 - Etapas compreendidas na ecotoxicologia denominada de cadeia da causalidade

Fonte: Costa et al ., 2008.

A Ecotoxicologia tem buscado definir limites aceitáveis de toxicidade por meio de protocolos padronizados de testes de toxicidade que possam vir a ser utilizados como limite guia para tomadas de decisões (Hoffman et al., 2002). Contudo a utilização de testes de toxicidade padronizados oferecem ainda outras vantagens, uma vez que facilita a comparação de dados obtidos entre laboratórios, contribuindo na utilização de dados já publicados e permitindo a reprodutibilidade dos ensaios (Zagatto, 2008).

No Brasil, uma das primeiras iniciativas para desenvolver uma metodologia na área de Ecotoxicologia ocorreu no ano de 1975, com a participação da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) em um programa de padronização internacional de testes de toxicidade aguda para peixes, desenvolvido pelo Comitê Técnico das Águas TC147 da International Organization for Standardization (ISO). Atualmente, vários já são os ensaios padronizados por organizações e associações nacionais e internacionais (Zagatto, 2008).

3.4.1. Testes de toxicidade

Testes de toxicidade são utilizados para avaliar os potenciais efeitos adversos de substâncias tóxicas sobre organismos de diferentes ecossistemas. Os testes de toxicidade e as análises físicas e químicas que identificam e quantificam as concentrações das substâncias tóxicas em amostras ambientais são análises complementares para avaliar o risco ambiental destas substâncias (Seco et al., 2003; Costa et al., 2008).

Os testes de toxicidade vêm sendo cada vez mais utilizados para fins diversos, tais como, determinar a toxicidade de compostos químicos, efluentes líquidos e percolados de resíduos sólidos, estabelecer limites máximos para lançamentos de descarte de contaminantes, realizar o monitoramento ambiental (Nascimento et al., 2008).

Diferentes órgãos internacionais, como Environmental Protection Agency (US EPA), American Society for Testing and Materials (ASTM), Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), vêm buscando a padronização de novos ensaios de toxicidade com espécies diversas, que apresentam respostas significativas à exposição a compostos tóxicos, visando por meio destes novos ensaios oferecer uma proteção ambiental mais abrangente (Aragão et al., 2008).

Testes de toxicidade podem ser classificados como agudos e crônicos e estes diferem, sobretudo quanto ao tempo de exposição do organismo ao contaminante e a forma como os resultados finais são avaliados (Adams et al., 2002).

Os testes de toxicidade aguda têm como finalidade avaliar a ocorrência de efeitos severos e rápidos sobre os organismos, como a mortalidade e/ou imobilidade de 50% dos organismos expostos, uma vez que este critério é facilmente determinado, apresenta um importante significado ecológico para o ambiente e pode ser avaliado em curto prazo (Adams et al., 2002; Yu, 2004; Aragão et al., 2008). De forma geral, os testes de toxicidade

aguda permitem estimar a dose ou a concentração que uma dada substância tóxica poderia provocar um efeito tóxico específico mensurável a um organismo teste ou população em um tempo de exposição relativamente curto em relação à vida do organismo (Adams et al., 2002; Aragão et al., 2008).

Nos testes de toxicidade aguda os resultados obtidos podem ser avaliados por meio dos valores de CI50 concentração de inibição a 50% dos organismos expostos e CE50 concentração efetiva que causa efeito à 50% dos organismos expostos (Aragão et al., 2008; Costa et al., 2008).

Entretanto, o fato de uma substância química não produzir efeitos adversos de mortalidade e/ou imobilidade aos organismos teste não indica necessariamente que esta substância não seja tóxica (Aragão et al., 2008).

Os testes de toxicidade crônica têm como objetivo avaliar os efeitos subletais, ou seja, os efeitos tóxicos que uma substância química é capaz de causar a um organismo quando este é exposto por longos períodos ou por uma fase considerável ou todo o ciclo de vida do organismo a concentrações que permitem sua sobrevivência, entretanto, são capazes de alterar funções como a reprodução, o crescimento, o comportamento, entre outros (Adams et al., 2002; Yu, 2004).

Nos testes de toxicidade crônica os resultados obtidos são expressos como CENO concentração de efeito não observado e CEO concentração de efeito observado (Adams et al., 2002; Aragão et al., 2008).

3.4.2. Organismos teste

A toxicidade é uma propriedade que reflete os efeitos adversos que uma substância pode causar a um organismo teste. A intensidade destes efeitos depende da concentração e propriedades químicas da substância, da sensibilidade do organismo teste e do tempo de exposição. Deste modo, é recomendável que o efeito tóxico de uma amostra seja avaliado com a

realização de testes de toxicidade com organismos de espécies diferentes e preferencialmente de níveis tróficos diversos (FIG. 5) (Costa et al., 2008).

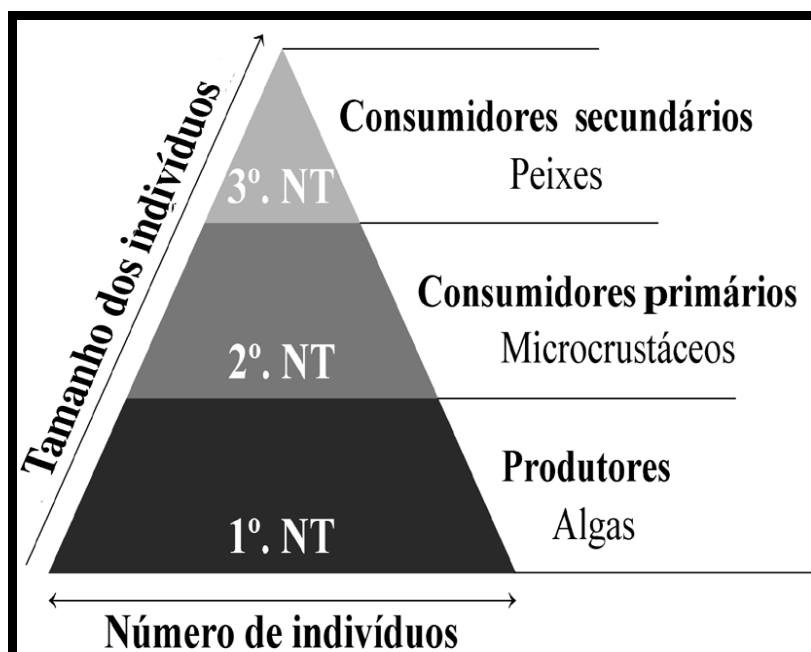


FIGURA 5 – Exemplo de uma cadeia alimentar de um ecossistema aquático constituído por três níveis tróficos (NT)

Fonte: Costa et al., 2008.

Das espécies de organismos que são utilizados em testes de toxicidade deve se conhecer previamente a fisiologia, genética e o comportamento destes organismos, a fim de facilitar e garantir a interpretação dos resultados. Para uma espécie poder ser utilizada como organismo teste é necessário que esta apresente uma seletividade constante aos contaminantes, seja uma espécie disponível em abundância, representativa em seu nível trófico e que possa ser facilmente cultivada e adaptada às condições de laboratório (Costa et al., 2008; Domingues et al., 2008).

As diferentes características biológicas entre as espécies de organismos teste refletem como estes organismos respondem a exposição de uma substância tóxica a uma dada concentração, isto é, as diferentes espécies têm sensibilidades diferentes (Posthuma et al., 2002)

Atualmente, organismos teste como as bactérias, algas, microcrustáceos, minhocas e peixes, têm sido amplamente utilizados em testes de toxicidade padronizados no Brasil. Na TAB. 4 foram apresentadas as espécies e os tipos de ensaios, agudo ou crônico, utilizados para cada organismo (Costa et al., 2008).

TABELA 4 – Organismos teste, efeito e espécie utilizados em testes de toxicidade no Brasil

Organismo	Efeito	Espécie
Bactéria	Agudo	<i>Vibrio fischeri</i> , <i>Spirillum volutans</i>
Alga	Crônico	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> , <i>Chlorella vulgaris</i>
Microcrustáceo	Agudo	<i>D. similis</i> , <i>Daphnia magna</i>
Microcrustáceo	Crônico	<i>Ceriodaphnia dubia</i> , <i>Ceriodaphnia silvestri</i>
Oligoquetas	Agudo	<i>Eisenia andrei</i> , <i>Eisenia fetida</i>

Fonte: adaptado de Costa et al., 2008.

Na TAB. 5 foi apresentada a indicação dos ensaios de toxicidade e organismos teste para alguns tipos de amostras.

TABELA 5 – Indicação de ensaios de toxicidade e organismos teste para diferentes tipos de amostras

Tipo de amostra	Tipo de ensaio	Organismo teste
Água continental	Aguda / crônica	Bactérias, <i>Daphnia</i> , <i>C. dubia</i> e/ou peixes
Efluentes líquidos	Aguda / crônica	Algas, Ouriços, <i>Daphnia</i> e/ou <i>C. dubia</i>
Solo	Aguda / crônica	<i>Esenia fetida</i> (minhoca)
Lixiviado artificial de solo	Aguda / crônica	Testes exploratórios*
Chorume	Aguda / crônica	Algas, <i>Daphnia</i> , peixes e/ou <i>C. dubia</i>
Lixiviado de resíduos sólidos	Aguda / crônica	Testes exploratórios*

* Testes exploratórios: ensaios com *D. similis*, peixes e/ou bactéria *V. fischeri*

Fonte: adaptado de Aragão et al., 2008

Para assegurar a viabilidade dos resultados obtidos nos ensaios realizados com organismos teste substâncias de referência são empregadas para estabelecer uma faixa de resultados aceitáveis para sensibilidade dos organismos (Zagatto et al., 2008). É recomendada, de acordo com Environment Canada (1990), a realização de um ensaio por mês com as substâncias de referências. Dentre as substâncias de referências que vêm sendo empregadas em testes de toxicidade com organismos aquáticos no Brasil estão o dicromato de potássio, sulfato de cobre, sulfato de zinco, cloreto de cádmio, nitrato de chumbo, cloreto de mercúrio, sulfato de níquel, cloreto de sódio, cloreto de amônio, cloreto de potássio e fenol (Zagatto et al., 2008).

Segundo Sobrero (2004) o sulfato de zinco é a substância de referência mais indicada para assegurar a variabilidade e a viabilidade dos lotes de sementes empregados em ensaios de germinação e desenvolvimento das radículas de *L. sativa*, devido ao seu potencial tóxico conhecido para estes organismos testes.

3.4.3. Ensaio de germinação e desenvolvimento das radículas com *Lactuca sativa*

Os ensaios de germinação e desenvolvimento das radículas com sementes de diversas plantas superiores, tais como, a *L. sativa*, popularmente conhecida como alface, vêm sendo cada vez mais aplicados para a avaliação da toxicidade de compostos solúveis em água pura e também em misturas complexas, tais como, efluentes industriais, águas residuais, lixiviados de solos, sedimentos, entre outras matrizes (Bowers et al., 1997). Estes ensaios quando utilizados para avaliar a toxicidade de lixiviados de solos podem ser representativos tanto para a água subterrânea quanto para a horticultura (Ferreira, 2007).

Ensaio de germinação e desenvolvimento da radícula de sementes são ensaios padronizados internacionalmente por órgãos como a US EPA (1996) e OECD (2003), no entanto, no Brasil estes ensaios ainda não são padronizados. Estes ensaios vêm sendo cada vez mais utilizados na avaliação

de potenciais danos ambientais devido ao seu custo relativamente baixo, a curta duração dos ensaios e a sensibilidade que estes organismos teste apresentam a substâncias tóxicas (Sobrero et al., 2004).

Ensaio de germinação e desenvolvimento das radículas com sementes de plantas superiores apresentam vantagem em relação aos ensaios de toxicidade que utilizam como organismos teste algas e plantas aquáticas devido ao fato de não haver necessidade da amostra líquida ser filtrada previamente por causa da turbidez e material particulado em suspensão nas amostras (Sobrero et al., 2004). Sendo assim, a amostra líquida é preservada sem retenção de substâncias que poderiam apresentar toxicidade. Além disso, não são necessários ajustes de dureza e pH das amostras líquidas.

As sementes de *L. sativa* têm características ideais para a realização de bioensaios, visto que estas apresentam um ciclo de vida curto, tem grande importância para a agricultura e o seu cultivo é difundido em quase todo o mundo (Ferreira, 2007).

A avaliação do efeito tóxico é determinada por meio da germinação das sementes e do desenvolvimento das radículas. Na FIG.6 é representada uma semente germinada com sua radícula desenvolvida. (Sobrero et al., 2004).

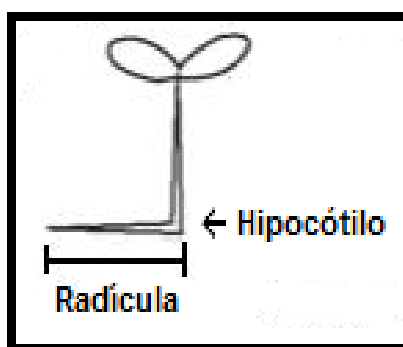


FIGURA 6 – Semente germinada de *L. sativa* com sua radícula desenvolvida

Fonte: adaptado de Sobrero et al., 2004.

É importante destacar que os bioensaios de germinação com sementes de plantas são realizados durante os primeiros dias de seu

desenvolvimento nos quais ocorrem uma série de processos fisiológicos importantes e a presença de uma substância tóxica pode causar efeitos adversos, resultando em uma série de anomalias e até mesmo interferir na sobrevivência desta planta (Sobrero et al., 2004; Environmental Canada, 2005).

Os ensaios de germinação e desenvolvimento das radículas de *L. sativa* são ensaios de toxicidade aguda, ou seja, uma avaliação dos efeitos letais. Entretanto, neste mesmo ensaio podem ser avaliados também os efeitos subletais por meio dos potenciais efeitos tóxicos sobre o desenvolvimento das radículas (Sobrero et al., 2004).

O efeito letal é avaliado por meio da determinação da concentração que causa inibição sobre a germinação de 50% dos organismos expostos e o efeito subletal por meio dos valores médios de CENO e CEO que estão relacionados com o desenvolvimento das radículas das sementes germinadas (Sobrero et al., 2004).

3.4.4. Ensaio de toxicidade aguda com *Daphnia similis*

Dentre os organismos de água doce passíveis de serem utilizados em testes de toxicidade aguda estão diversos cladóceros (microcrustáceos branquiópodes) do gênero *Daphnia*, dentre os quais encontram se espécies como a *D. magna*, *D. pulex* e *D. similis*. Esses cladóceros são popularmente conhecidos como pulgas d`água (FIG. 7) (Burton et al., 2002; Costa et al 2008).



FIGURA 7 – *Daphnia similis*

Fonte: Lameira 2008.

Os cladóceros têm sido tradicionalmente utilizados para a avaliação da toxicidade tanto de substâncias químicas puras como de amostras complexas, tais como águas residuais, águas superficiais, lixiviados entre outras, sendo a espécie *D. similis* a mais representativa em testes de toxicidade aguda no Brasil, uma vez que estes testes já são padronizados pela norma ABNT NBR 12713/2004 (Domingues et al., 2008). Segundo Valavanidis et al. (2010) o uso de tais organismos em testes de toxicidade para avaliar a contaminação de matrizes aquáticas por metais tóxicos tem sido reportado de forma satisfatória ao longo dos anos.

De forma geral, os microcrustáceos têm sido organismos muito utilizados para realização de testes de toxicidade, devido a grande abundância em corpos de água doce, ciclo de vida curto, fácil cultivo em laboratório, sensibilidade a diversos contaminantes e funções significativas na cadeia alimentar, uma vez que estes organismos são uma importante fonte de alimentação para peixes. Outra característica importante é a estabilidade genética que estes organismos apresentam, assegurando a obtenção de organismos teste com uma sensibilidade constante (Costa et al., 2008).

A espécie *D. similis* é utilizada em testes de toxicidade aguda nos quais diferentes organismos jovens são expostos a diferentes concentrações de uma substância tóxica ou a uma mistura complexa. Os efeitos tóxicos observados são a mortalidade e/ou a imobilidade dos organismos expostos. E com estes resultados por meio de métodos estatísticos se determina a concentração que causa efeito agudo de imobilidade e/ou mortalidade a 50% dos organismos, CE50_{48h} (Domingues et al., 2008).

3.5. Estudos ecotoxicológicos para avaliação de elementos tóxicos

Vários estudos ecotoxicológicos (Martens et al., 1976; Adriano et al., 1980; Wang, 1987; Printes et al., 2000; Cook et al., 2002; Seco et al., 2003; Meza et al., 2007; Guerra, 2009; Sukandar et al., 2009; Chapman et al., 2010; Wu et al., 2012) têm sido realizados para avaliar a toxicidade de amostras de águas superficiais, sedimento, lodo de esgoto e lixiviados de colunas de solos

contaminados utilizando como organismos teste os microcrustáceos, sementes de hortaliças, bactéria, algas, anelídeos. Dentre estes estudos aqueles que buscam avaliar elementos tóxicos em amostras líquidas têm reportado cada vez mais a utilização de sementes de plantas como organismos teste.

Martens et al. (1976) e Adriano et al. (1980) avaliaram a toxicidade de solo com cinza de carvão e de lixiviados de cinza de carvão empregando como organismos teste sementes de *Zea mays* (milho) e *Medicago sativa* (alfafa) e sementes de *Sorghum bicolor* (capim), respectivamente. Foram observados efeitos tóxicos à germinação das sementes *Z. mays* e *M. sativa*, bem como, à germinação das sementes de *S. bicolor* expostas ao solo com cinza de carvão. No entanto, nos ensaios com lixiviados de cinza de carvão foi observada uma redução dos efeitos tóxicos para as sementes de *Z. mays* e *M. sativa* e para as sementes de *S. bicolor*.

Wang (1987) avaliou a toxicidade dos elementos tóxicos (Cd, Cr, Cu, Mn, Ni e Zn) e compostos orgânicos em amostras de águas de descarte empregando como organismos teste sementes de *Cucumis sativus* (pepino), *Panicum milaceum* (milho) e *L. sativa* (alfaca), por meio do desenvolvimento da radícula das sementes germinadas. Foi observado efeitos tóxicos nas amostras para as sementes de *C. sativus*, *P. milaceum* e *L. sativa*, e a *L. sativa* apresentou uma maior sensibilidade aos metais tóxicos quando comparada com as demais espécies.

Cook et al. (2002) avaliaram a toxicidade dos lixiviados de colunas de solos contaminados por resíduos de hidrocarbonetos e elementos tóxicos empregando como organismos teste anelídeos (*Lumbricus terrestris*), sementes (*L. sativa* e *Panicum miliaceum*), algas (*Selenastrum capricornutum*) e bactérias (*Pseudomonas fluorescens*). Foi observado que os lixiviados de solos contaminados não apresentaram toxicidade aos anelídeos *L. terrestris*. Por outro lado, estes lixiviados apresentaram efeitos tóxicos com os demais organismos (*P. miliaceum*, *L. sativa*, *S. capricornutum*, *P. fluorescens*).

Seco et al. (2003) avaliaram a toxicidade dos lixiviados de resíduos de esgoto, escória e de cinzas por meio de testes de toxicidade aguda com *D. magna*, e observaram efeito tóxico dos lixiviados ao organismo teste .

Fuentes et al. (2006) avaliaram a toxicidade dos elementos Cd, Cu, Cr, Fe, Ni, Pb e Zn em extratos de lodo de esgoto empregando como organismos teste sementes de *Hordeum vulgare* (cevada) e de *Lepidium sativum* (agrião). Foram avaliados a germinação das sementes e o desenvolvimento das radículas e não foram observados efeitos tóxicos dos extratos nos organismos *H. vulgare* e *L. sativum*.

Meza et al. (2007) avaliaram a toxicidade de efluentes industriais contaminados com elementos tóxicos por meio da germinação das sementes de *L. sativa* e a redução da mobilidade da *D. pulex*, sendo observados efeitos tóxicos para ambas espécies.

Sukandar et al. (2009) avaliaram a toxicidade de extrato de cinza de material hospitalar contida por As, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, Zn e Sn, utilizando ensaios de germinação e desenvolvimento das radículas de sementes de *L. sativa*, ensaios com a bactéria *Vibrio fischeri* e ensaios de toxicidade aguda com o microcrustáceo *D. magna*. Foram observados efeitos tóxicos para as três espécies.

Chapman et al. (2010) avaliaram a toxicidade de percolados de solos contaminados com elementos tóxicos (As, Ba, Cd, Cr, Co, Cu, Pb, Hg, Mo, Ni, Ag e Zn) por meio de ensaios de toxicidade utilizando como organismos teste os cladóceros *D. magna*, sementes de *L. sativa* e sementes de *Tricum aestivum* (trigo). Foram observados efeitos tóxicos a germinação das sementes e ao desenvolvimento das radículas dos organismos teste *L. sativa*, entretanto, não foram observados efeitos tóxicos a *D. magna* e *T. aestivum*.

Wu et al. (2012) avaliaram a toxicidade de solubilizado de nanopartículas de óxidos de metais (CuO, NiO, TiO₂, Fe₂O₃, CO₃O₄) utilizando como organismos teste sementes de *Raphanus sativus* (rabanete), *C. sativus*

(pepino) e *L. sativa* (alface). Foram observados maiores efeitos tóxicos a sementes de *L. sativa* quando comparados com as demais sementes.

No Brasil estudos relacionados com a avaliação ecotoxicológica de amostras diversas, tais como, águas de chuva, chorume gerado do tratamento da água de produção de petróleo, águas superficiais e sedimentos (Printes et al., 2000; Guerra, 2009; Martins, 2009) têm sido publicados e poucos estudos relacionados com a toxicidade de amostras de cinza de carvão (Leffa, 2008). Os estudos brasileiros que envolvem o descarte inadequado de cinzas de carvão sobre o solo têm descrito a concentração de elementos tóxicos na atmosfera, águas superficiais, solos e sedimento (Cerutti et al 2000; Prochnow et al., 2000; Rohde et al., 2000; Schneider et al., 2000; Flues et al., 2008), mas não têm descrito sobre avaliação ecotoxicológica.

Printes et al. (2000) realizaram o monitoramento e controle ambiental de amostras de águas superficiais e sedimentos da região Carbonífera do Baixo Jacuí, no Rio Grande do Sul, utilizando ensaios de toxicidade aguda e crônica com os microcrustáceos *D. similis* e *C. dubia*, respectivamente. Foram observados efeitos tóxicos tanto nos ensaios de toxicidade aguda com *D. similis* como nos ensaios de toxicidade crônica com *C. dubia* para as amostras de água superficial. Para as amostras de sedimento foram observados efeitos tóxicos nos ensaios de toxicidade crônica com *C. dubia*.

Leffa (2008) avaliou a genotoxicidade do rejeito do carvão mineral utilizando testes de toxicidade aguda com o molusco *Helix aspersa*. Foi observado um efeito genotóxico ao molusco *H. aspersa* quando comparado ao grupo controle.

Guerra (2009) avaliou a toxicidade do extrato do lodo ou chorume gerado em um reator biológico pelo tratamento da água de produção do petróleo, empregando como organismos teste sementes de *Cucumis sativus* (pepino), *Barbarea verna* (agrião), *Brassica oleracea* (couve) e *Eruca sativa* (rúcula). Foi observado efeito tóxico nas amostras para todos os organismos e

as espécies *C. sativus* e *B. verna* apresentaram uma maior sensibilidade a qual foi atribuída ao baixo potencial osmótico e toxicidade de íons presentes em alta concentração.

Martins (2009) avaliou a toxicidade de amostras de água de chuva coletadas na Região Metropolitana de São Paulo e nas cidades de Taiaçupeba e Mogi das Cruzes utilizando como organismos teste microcrustáceos *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia dubia*, bactéria *Vibrio fischeri* e alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. Foi observada toxicidade nas amostras de água de chuva coletadas na Região Metropolitana de São Paulo e Taiaçupeba aos organismos teste *D. similis*, *V. fischeri* e *C. dubia* e apenas para as amostras de água de chuva coletadas na Região Metropolitana de São Paulo também foi observada toxicidade crônica nos ensaios realizados com *P. subcapitata*.

Estudos como os realizados por Martens et al. (1976), Adriano et al. (1980) e Printes et al (2000) ressaltam a importância de se avaliar o potencial tóxico da cinza de carvão e os danos que este resíduo pode causar ao meio ambiente. Essa importância e os poucos trabalhos brasileiros publicados que relacionam a avaliação da toxicidade de amostras de cinza de carvão justificam o presente estudo.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho faz parte de um projeto financiado pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), cujo nome é “Mobilidade e transporte de As, Cd, Mo, Pb e Zn em colunas de solos tropicais contaminadas com cinza de carvão da usina termoelétrica de Figueira, Paraná”. Neste projeto foram realizados dois estudos para avaliar a mobilidade dos elementos tóxicos em colunas de solo com cinza de carvão e a contaminação dos solos (Lange, 2012; Silva, 2013).

No presente estudo a toxicidade dos percolados da coluna de cinza de carvão e das colunas de solo com cinza de carvão obtida nos estudos desenvolvidos por Lange (2012) e Silva (2013) foi avaliada por meio de ensaios de germinação e desenvolvimento das radículas e ensaios de toxicidade aguda empregando como organismos teste a dicotiledônea *L. sativa* e o microcrustáceo *D. similis*, respectivamente.

Os ensaios ecotoxicológicos foram realizados no laboratório de ecotoxicologia do Centro de Química e Meio Ambientes (CQMA) do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/CNEN-SP).

4.1. Obtenção dos percolados das colunas de cinza de carvão e de solo com cinza de carvão

Os percolados das colunas de cinza de carvão e de solo com cinza de carvão foram obtidos dos estudos desenvolvidos por Lange (2012) e Silva (2013) que fazem parte do mesmo grupo de trabalho do presente estudo.

Nos estudos de Lange (2012) e Silva (2013) foram preparadas colunas com dois solos de texturas diferentes, um franco arenoso e outro argiloso, respectivamente. Os solos foram coletados no estado de São Paulo, em 2009, em áreas de mata nativa ou de reflorestamento antigo, com pouca perturbação antropogênica. O solo de textura franco arenosa foi coletado entre os municípios de Araras e Conchal e o solo de textura argilosa no município de

Piracicaba. Estes solos foram selecionados para coleta por serem latossolos (classe de solo mais representativa do Brasil e do Estado de São Paulo) e por apresentarem diferentes características químicas e físicas.

Estes solos (286 g do solo franco arenoso e 279 g do solo argiloso) foram compactados separadamente em colunas de acrílico com uma prensa manual com base na densidade e umidade dos solos para simular as características dos solos coletados em campo. A dimensão das colunas utilizadas foi de 5 cm de altura por 8 cm de diâmetro. No topo das colunas de solo foi adicionada 50 g cinza de carvão. Esta cinza de carvão foi proveniente da usina termelétrica de Figueira, Paraná. Uma coluna de cinza de carvão também foi preparada com a mesma quantidade de cinza adicionada no topo das colunas de solo e na mesma dimensão, contudo o solo foi substituído por areia inerte nesta coluna.

As colunas foram percoladas com uma solução aquosa de pH 4,5 composta por ácido nítrico e ácido sulfúrico para simular a água de chuva, por um período de 336 dias. O volume da solução adicionado nas colunas foi calculado com base na média do índice pluviométrico mensal dos últimos anos (1933 – 2008) da cidade de São Paulo. O volume da solução adicionado em cada coluna foi 6914 mL, que corresponde a um ano de precipitação. Na FIG.8 foi apresentado o sistema de percolação das colunas.

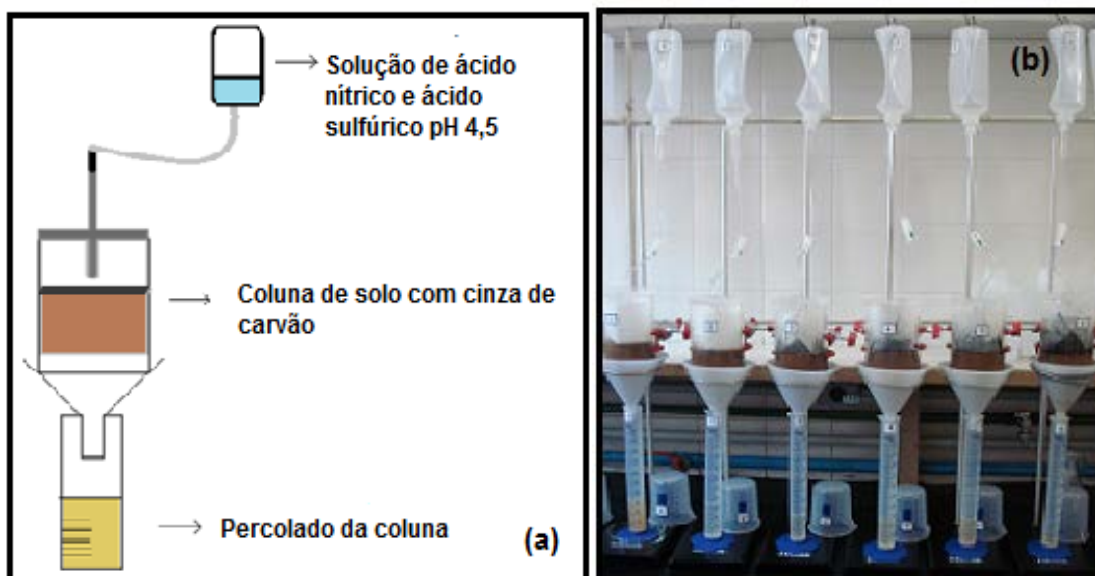


FIGURA 8 - (a) Esquema experimental do sistema de percolação da coluna de solo com cinza de carvão; (b) Foto do sistema de percolação das colunas de solo franco arenoso com cinza de carvão

Os percolados gerados de três colunas foram coletados a cada 28 dias em um período de 336 dias de percolação das colunas, gerando 12 amostras para cada coluna, portanto, um total de 36 amostras de percolado. Os percolados provenientes das três colunas foram denominados como C (percolado da coluna de cinza de carvão), SPC (percolado da coluna de solo de Piracicaba com cinza de carvão) e SCC (percolado da coluna de solo de Conchal/Araras com cinza de carvão). Na FIG.9 foram apresentados os percolados gerados das colunas ao longo de 336 dias de lixiviação.

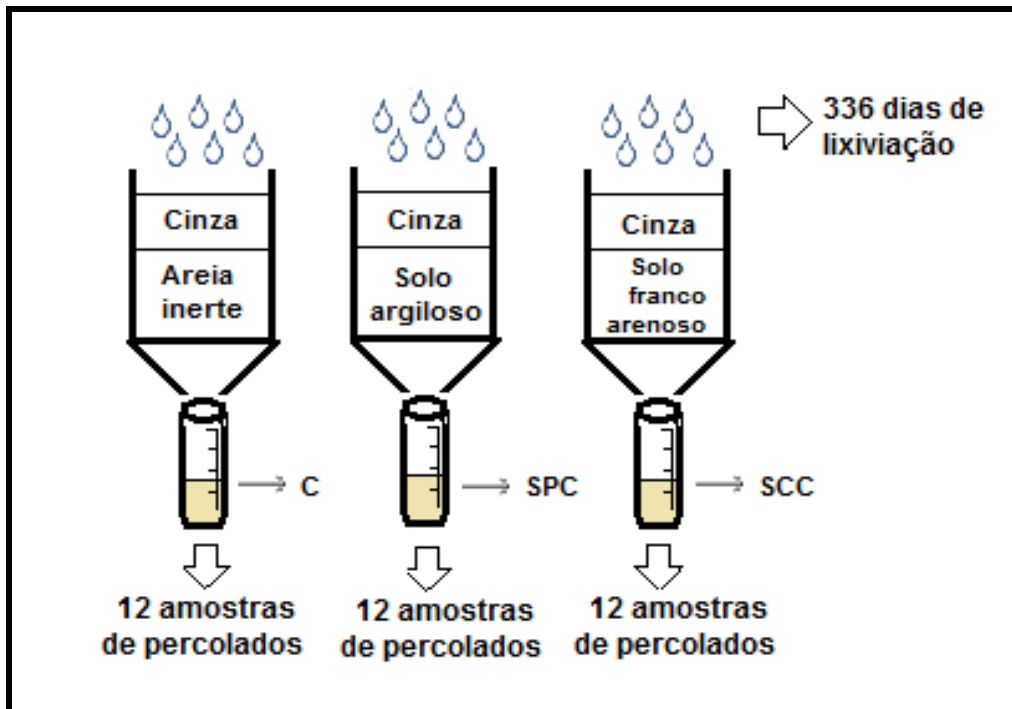


FIGURA 9 – Percolados C, SPC e SCC gerados ao longo de 336 dias

Os 12 percolados de cada coluna foram denominados conforme a sequência da coleta como 28, 56, 84, 112, 140, 168, 196, 224, 252, 280, 308, 336.

4.2. Ensaio de germinação e desenvolvimento das radículas de *Lactuca sativa*

Os percolados das colunas de cinza de carvão e das colunas de solos com cinza de carvão foram submetidos a ensaios de toxicidade aguda de germinação e desenvolvimento das radículas, para avaliar tanto os efeitos letais por meio da não germinação das sementes como os efeitos subletais por meio do desenvolvimento das radículas. Nestes ensaios foram empregadas como organismos teste sementes orgânicas de *L. sativa* (alface manteiga), da Isla Pak, lote 28556 (validade das sementes: maio de 2013). Na TAB.6 foi descrito um resumo das condições utilizadas para a realização do ensaio de toxicidade com *L. sativa*.

TABELA 6 – Condições gerais utilizadas no ensaio de germinação e desenvolvimento da *L. sativa* e critérios de aceitabilidade

Organismo teste	<i>Lactuca sativa</i> (Asterales, Lactuca)
Tipo de ensaio	Estático
Número de organismos teste por réplica	20 sementes
Número de réplicas	4
Volume de amostra do percolado	3 mL
Água de diluição	Água deionizada
Concentrações da amostra do percolado	100% → 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,125%
Substrato	Papel de filtro qualitativo (porosidade 14 µm)
Recipiente do teste	Placa de Petri (diâmetro 9,5 cm)
Temperatura	25 ± 2°C
Fotoperíodo	16 horas de luz / 8 horas de escuro
Duração do ensaio	120 horas
Controle negativo	Água deionizada
Controle positivo	Solução de Zn(SO ₄) ₂ 0,04g L ⁻¹
Efeito avaliado	Número de sementes germinadas e comprimento das radículas
Critérios de aceitabilidade	Carta controle, germinação das sementes no controle negativo >80%, comprimento das radículas ≥ 5 mm, variabilidade do comprimento das radículas ≤ 30% no controle negativo
Resultado final	CI50 _(120h) , IG, CENO e CEO
Referências	US EPA (1996); OECD (2003); Sobrero et al.(2004)

Inicialmente foi realizado um ensaio preliminar para cada uma das 12 amostras de percolados das colunas de cinza de carvão e de solos com cinza de carvão a fim de avaliar previamente a toxicidade ou não destes percolados. Para isso ensaios de germinação e de desenvolvimento das radículas das amostras puras dos percolados (concentração 100%) foram comparados a um controle negativo (água deionizada) seguindo as condições descritas na TAB.6. As amostras de percolados que apresentaram toxicidade no ensaio preliminar foram submetidas a um ensaio definitivo. Para a realização do ensaio definitivo foram preparadas as seguintes diluições (50, 25, 12,5, 6,25 e 3,125%) tomando-se como base a concentração 100% das amostras dos percolados.

Para a realização do ensaio vinte sementes de *L. sativa* foram dispostas de forma equidistante na base de uma placa de Petri, na qual foi previamente coberta por um papel de filtro (porosidade 14 μm) umedecido com 3 mL da amostra a ser testada. Posteriormente, as placas de Petri foram vedadas com filme plástico e, então, acondicionadas em uma câmara de germinação com temperatura e fotoperíodo controlados por um período de 120 horas. Após esse período foi registrado tanto o número de sementes não germinadas e germinadas, como também o tamanho das radículas (USEPA, 1996; OECD, 2003). Na FIG.10 foram apresentadas fotos do ensaio de germinação e desenvolvimento das radículas de *L. sativa*.

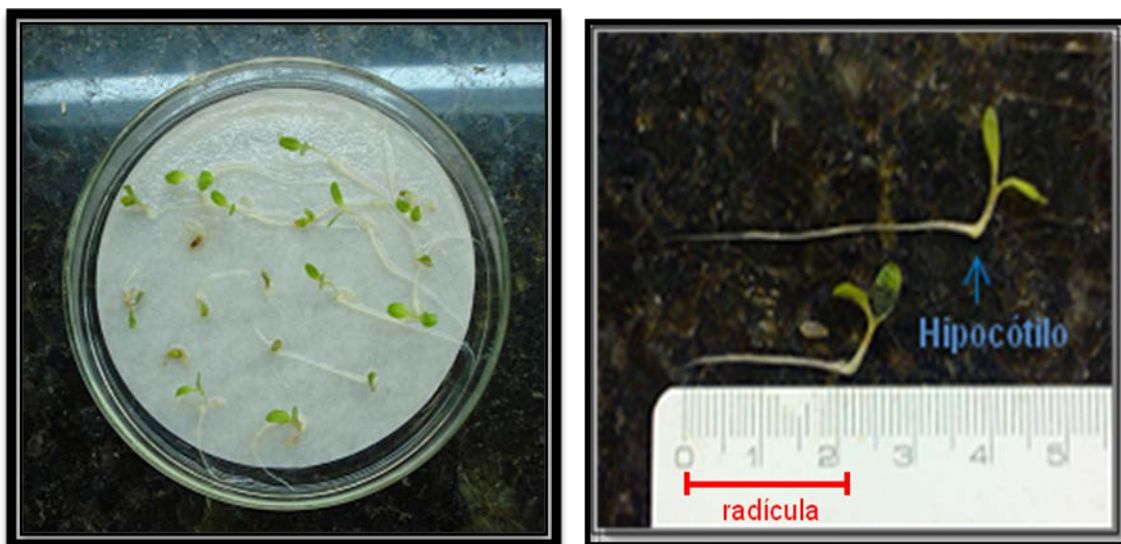


FIGURA 10 – Fotos do ensaio de germinação e desenvolvimento das radículas de *L. sativa*

A carta controle dos ensaios com sementes de *L. sativa* foi determinada por meio da média (\pm dois desvios padrões) dos valores obtidos para $CI50_{(120h)}$ para os cinco primeiros ensaios, utilizando como substância de referência uma solução de sulfato de zinco $0,04 \text{ g L}^{-1}$ (controle positivo) e como controle negativo a água deionizada. Tomando-se como base essa solução de sulfato de zinco $0,04 \text{ g L}^{-1}$ foram realizadas as seguintes diluições 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,125%. Estes ensaios que foram utilizados para determinação da carta controle foram realizados mensalmente, paralelamente aos ensaios preliminares e definitivos.

4.3. Ensaio de toxicidade aguda com *Daphnia similis*

Os percolados das colunas de cinza de carvão e das colunas de solo com cinza de carvão foram submetidos a ensaios de toxicidade aguda, empregando-se como organismos teste neonatas (organismos jovens com menos de 24 horas de vida) do microcrustáceo *D. similis*. Na TAB.7 foram descritas as condições gerais dos ensaios de toxicidade aguda com *D. similis*.

TABELA 7 – Condições gerais do ensaio de toxicidade aguda com *D. similis* e critérios de aceitabilidade

Organismos teste	<i>Daphnia similis</i> (Cladocera, Crustacea)
Tipo de Ensaio	Estático
Número de organismos teste por réplica	5 neonatas
Número de réplicas	4
Volume de amostra do percolado	10 mL
Água de diluição	Água de cultivo para <i>D. similis</i>
Concentração das amostras de percolados	100% → 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,125%
Recipiente do ensaio	Tubos de ensaio
Temperatura	20 ± 2°C
Fotoperíodo	12 horas de luz /12 horas de escuro
Duração do ensaio	48 horas
Controle negativo	Água de cultivo para <i>D. similis</i>
Controle positivo	NaCl 10 g L ⁻¹
Efeito avaliado	Mortalidade e/ou imobilidade
Critérios de aceitabilidade	Carta controle, mobilidade e/ou sobrevivência ≥ 80% no controle negativo
Resultado final	CE50 _(48h)
Referência	ABNT NBR 12713/2004

Inicialmente foi realizado um ensaio preliminar para cada uma das 12 amostras de percolados das colunas de cinza de carvão e de solos com cinza de carvão a fim de avaliar previamente a toxicidade ou não destes percolados, assim como foi descrito para os ensaios de germinação e desenvolvimento das radículas de *L. sativa* no item 4.2. Para isso as amostras puras de percolados (concentração 100%) foram comparadas com a água de

cultivo para *D. similis* (controle negativo) seguindo as condições gerais descritas na TAB.7. As amostras de percolados que apresentaram toxicidade no ensaio preliminar foram submetidas a um ensaio definitivo no qual estas amostras de percolados foram utilizadas nas concentrações 100, 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,125%.

As amostras dos percolados foram previamente filtradas para a realização deste ensaio. Foram adicionados 10 mL das amostras em tubos de ensaios nos quais foram distribuídas cinco neonatas em cada réplica. Estes tubos de ensaios foram acondicionados em câmaras de germinação com temperatura e fotoperíodo controlados, durante um período de 48 horas. Após esse período foi registrado o número de organismos mortos e/ou imóveis. Em paralelo aos ensaios foram realizadas análises física e químicas (pH, condutividade elétrica, dureza da água) da água de cultivo que foi ajustada conforme a norma da ABNT NBR 12713 / 2004 (APÊNDICE C). Na FIG.11 foram apresentadas fotos do ensaio de toxicidade aguda com *D. similis*.

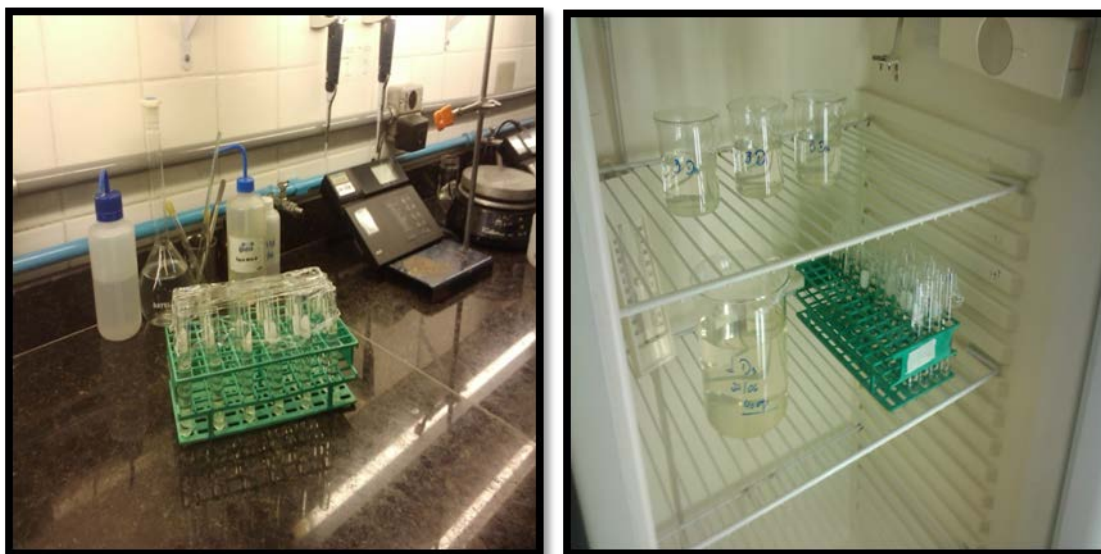


FIGURA 11 – Fotos do ensaio de toxicidade aguda com *D. similis*

A carta controle dos ensaios de toxicidade aguda para os organismos *D. similis* foi determinada por meio da média (\pm dois desvios padrões) dos valores obtidos para $CE50_{(48h)}$ para os cinco primeiros ensaios. Para a realização destes ensaios foi utilizada como controle negativo a água de

cultivo de *D. similis* e como substância de referência uma solução de cloreto de sódio 10 g L⁻¹ (controle positivo). Tomando-se como base essa solução foram realizadas as seguintes diluições 8,0, 4,0, 2,0, 1,0, 0,5 mg L⁻¹. Estes ensaios que foram utilizados para determinação da carta controle foram realizados mensalmente, paralelamente aos ensaios preliminares e definitivos.

4.4. Tratamentos estatísticos

Os tratamentos estatísticos dos dados obtidos nos ensaios preliminares e definitivos para ambos os organismos teste (*L. sativa* e *D. similis*) foram descritos separadamente nos subitens a seguir.

4.4.1. Ensaio preliminar

As análises estatísticas dos dados obtidos por meio do ensaio preliminar de germinação e desenvolvimento das radículas de *L. sativa* e de toxicidade aguda com *D. similis* foram realizadas de acordo com o fluxograma adaptado da USEPA (2002) apresentado na FIG.12, utilizando o programa estatístico Toxstat 3.5 (Gulley et al., 1995). De acordo com esta metodologia os valores obtidos para o número de sementes germinadas e o número de neonatas de *D. similis* mortas e/ou imóveis nos percolados foram analisados estatisticamente para avaliar se os percolados foram significativamente diferentes ou não quando comparados com o controle negativo, indicando a toxicidade aguda da amostra.

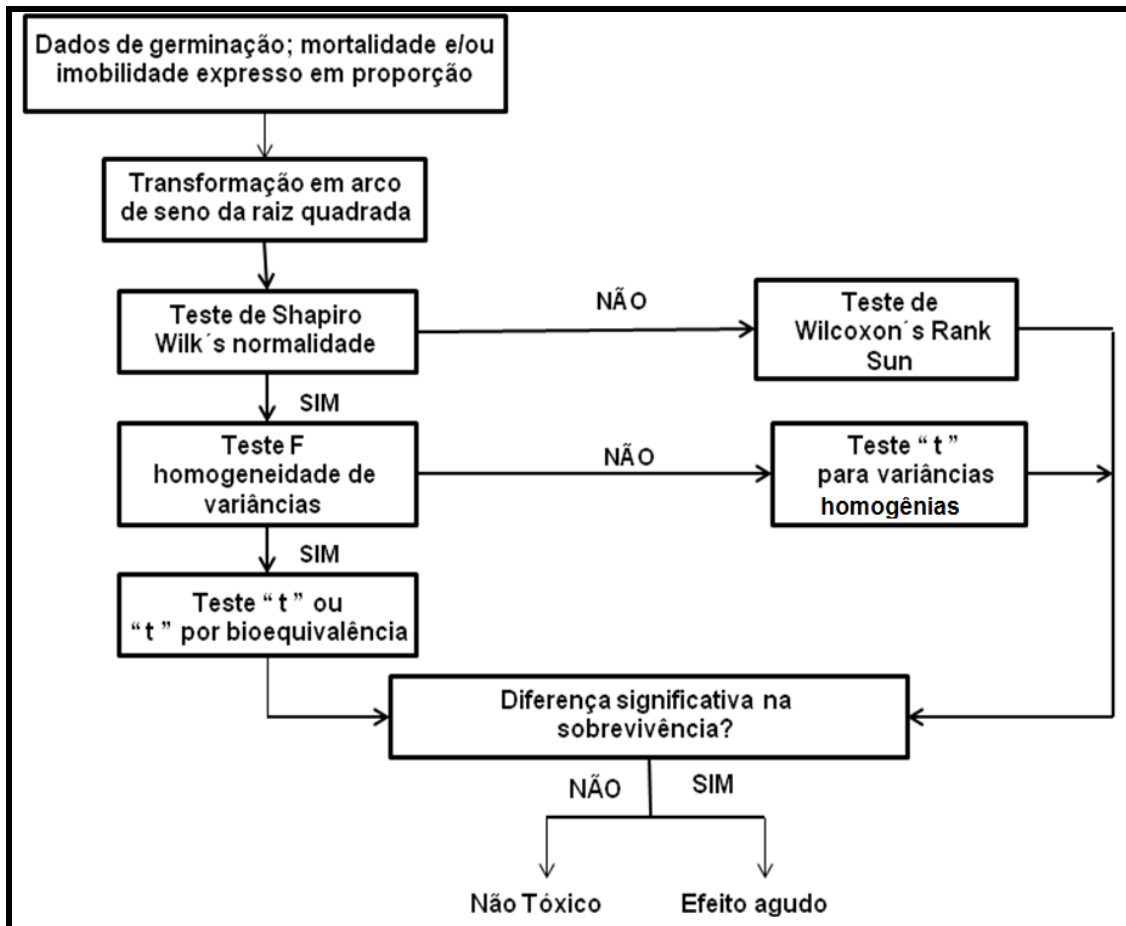


FIGURA 12 – Fluxograma para análise estatística dos dados do ensaio preliminar com uma única concentração e o controle negativo

Fonte: adaptado de US EPA, 1993

As amostras dos percolados das colunas que apresentaram toxicidade aguda no ensaio preliminar foram submetidas a ensaio definitivo.

No ensaio preliminar de germinação e desenvolvimento das radículas o valor médio do tamanho das radículas, o desvio padrão e o coeficiente de variação foram calculados. Para avaliar se o tamanho das radículas nos percolados das colunas de cinza de carvão e de solos com cinza de carvão foi significativamente diferente ou não quando comparado com o controle negativo tomou-se como base o fluxograma da FIG.13.

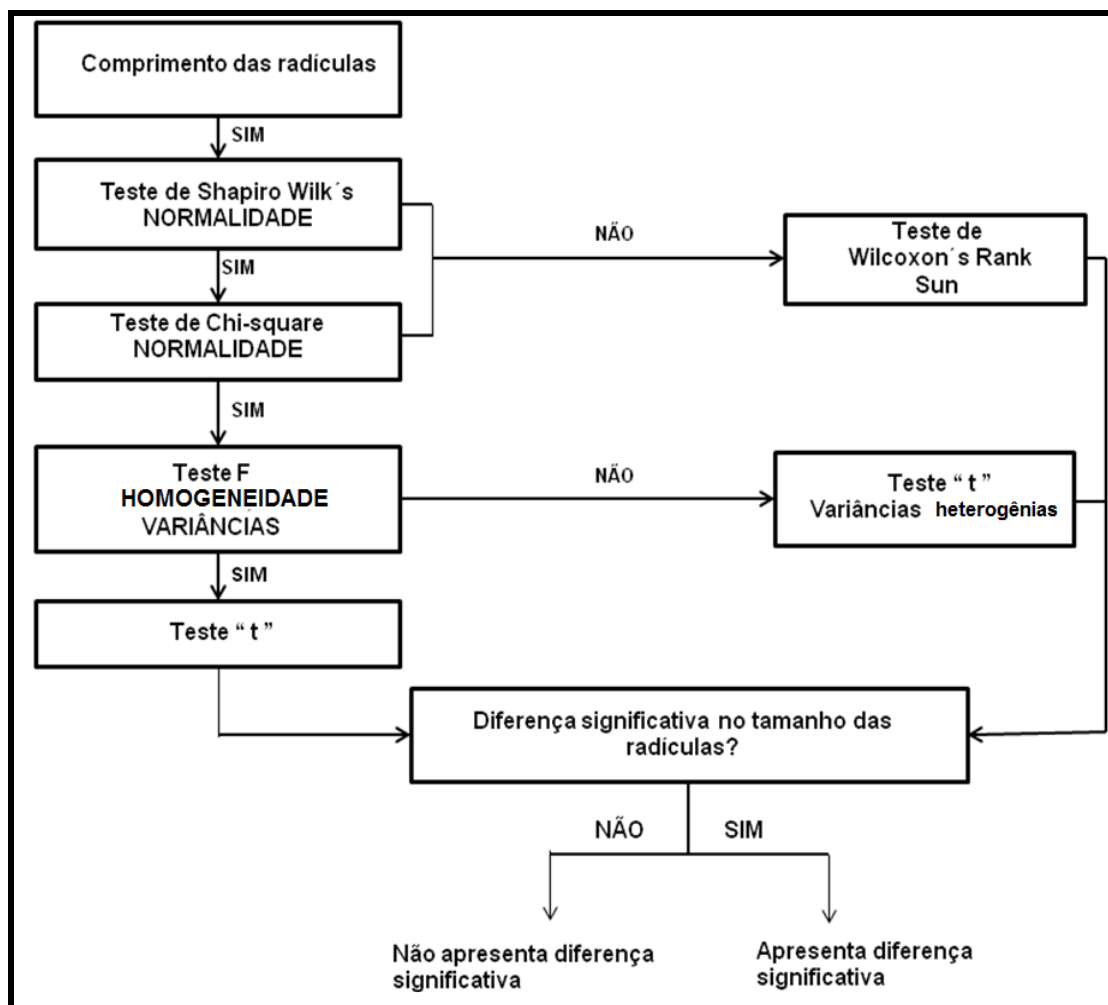


FIGURA 13 – Fluxograma para análise estatística dos dados do comprimento das radículas das amostras dos percolados e do controle negativo

4.4.2. Ensaio definitivo

As análises estatísticas dos dados obtidos por meio do ensaio definitivo de germinação e desenvolvimento das radículas de *L. sativa* (número de sementes germinadas em cada concentração) e do ensaio definitivo de toxicidade aguda com *D. similis* (número de neonatas mortas e/ou imóveis em cada concentração) foram realizadas por meio do programa estatístico Trimmed Spearman-Kärber, versão 1.5 (Hamilton et al., 1999). De acordo com esta metodologia foram determinados os valores de $CI50_{(120h)}$ (concentração de inibição em 50% dos organismos teste) para o ensaio definitivo de germinação e desenvolvimento das radículas de *L. sativa* e os valores de $CE50_{(48h)}$

(concentração efetiva que causa mortalidade e/ou imobilidade a 50% dos organismos teste) para o ensaio definitivo de toxicidade aguda com *D. similis*.

No ensaio definitivo de germinação e desenvolvimento das radículas de *L. sativa* os valores médios de CENO (concentração de efeito não observado) e CEO (concentração de efeito observado) foram determinados tomando como base os valores obtidos para o comprimento das radículas de acordo com o fluxograma descrito na FIG.14, os quais foram calculados por meio do programa estatístico Toxstat 3.5 (Gulley et al., 1995).

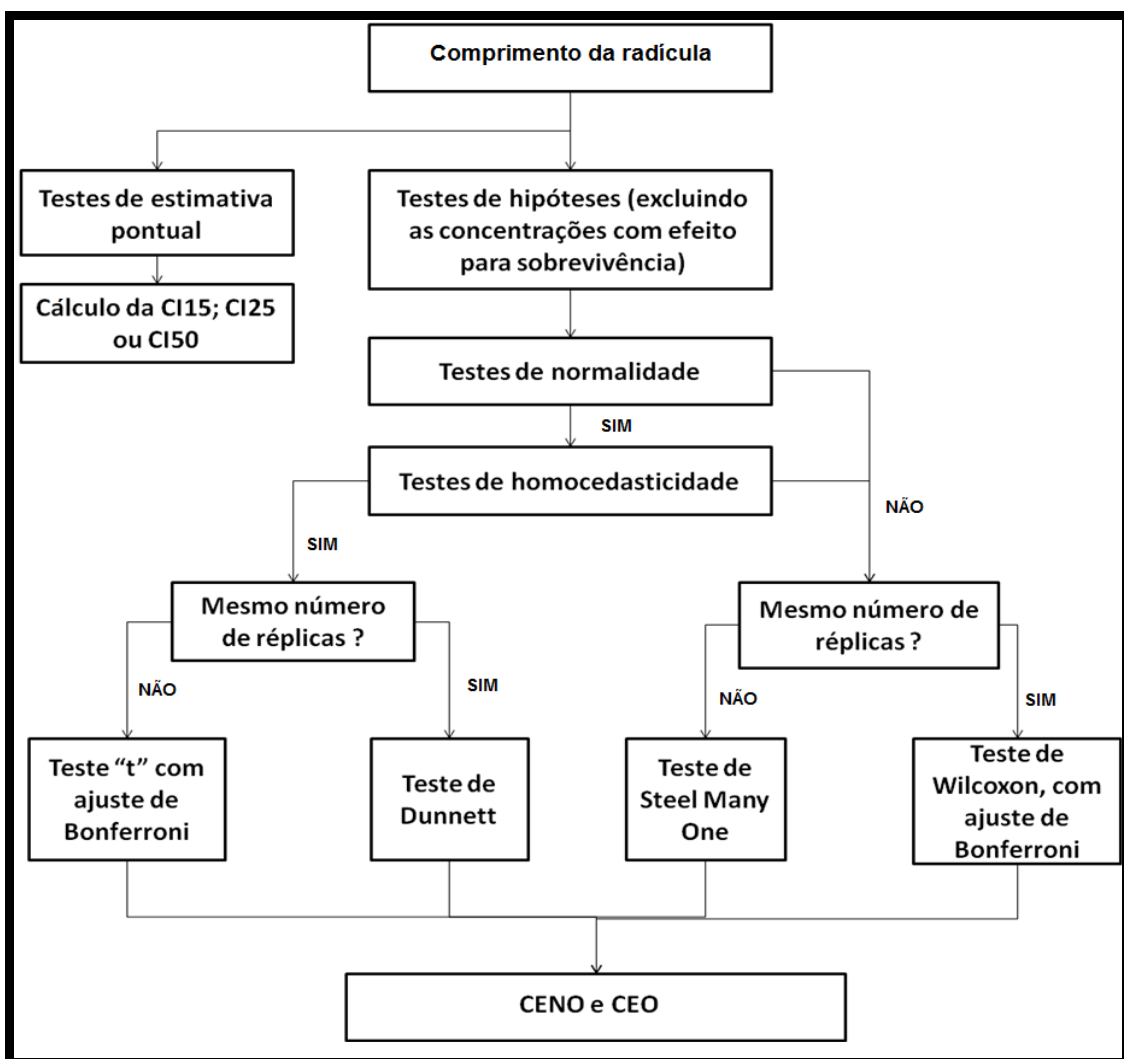


FIGURA 14 – Fluxograma para análise estatística dos dados dos efeitos subletais para o crescimento das radículas de *L. sativa*

Fonte: adaptado de US EPA, 1993.

No ensaio definitivo de germinação e desenvolvimento das radículas de *L. sativa* também foi calculado o IG (índice de germinação) das sementes dos percolados de acordo com a equação 1 (ASTM, 1994).

$$\% \text{ Índice de germinação} = \frac{\% \text{ germinação das sementes} \times \% \text{ crescimento das radículas}}{100} \quad (1)$$

Na qual

$$\% \text{ Germinação das sementes} = \frac{\% \text{ germinação no percolado}}{\% \text{ germinação no controle}} \times 100 \quad (2)$$

e

$$\% \text{ Crescimento médio das radículas} = \frac{\text{média do comprimento das radículas no percolado}}{\text{média do comprimento das radículas no controle}} \quad (3)$$

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os percolados das colunas de cinza de carvão e de solos com cinza de carvão foram avaliados quanto à toxicidade e as propriedades químicas e a concentração dos elementos destes percolados que foram descritas com base nos dados de Lange (2012) e Silva (2013).

5.1. Ensaios ecotoxicológicos

Foram realizados dois ensaios ecotoxicológicos: um de germinação e desenvolvimento da radícula de *L. sativa* e outro de toxicidade aguda com *D. similis*. Para a realização destes ensaios foi estabelecida uma carta controle para cada um com finalidade de determinar uma faixa de resultados aceitáveis para a sensibilidade dos organismos teste utilizados ao longo dos ensaios.

5.1.1. Ensaios de germinação e desenvolvimento das radículas de *L. sativa*

Os ensaios de germinação e desenvolvimento das radículas de *L. sativa* foram justificados no presente trabalho com base no texto descrito na revisão de literatura (itens 3.4.3 e 3.5) por serem utilizados para avaliar a toxicidade de amostras de lixiviados de solo e de resíduos, padronizados por agências internacionais e por apresentarem vantagem na preservação da amostra líquida, sem necessidade de filtração, em relação aos organismos teste alga e plantas aquáticas.

Os ensaios de germinação e desenvolvimento das radículas com sementes de *L. sativa* foram realizados para os percolados da coluna de cinza de carvão (percolado C) e para os percolados das colunas de solos com cinza de carvão (percolado SPC e percolado SCC).

5.1.1.1. Ensaios preliminares

Os ensaios preliminares foram realizados para determinar o potencial tóxico das amostras puras (concentração 100%) dos percolados das colunas de cinza de carvão e de solos com cinza de carvão.

Inicialmente, as amostras puras dos percolados foram comparadas ao controle negativo (água deionizada) por meio do teste t de Student com nível de significância de 0,05, conforme descrito no item 4.4.1. Na TAB.8 foram apresentados os resultados de toxicidade dos percolados obtidos por meio dos ensaios de germinação e desenvolvimento das radículas de sementes de *L. sativa*.

TABELA 8 – Toxicidade dos percolados C, SCC e SPC (concentração 100%) obtida nos ensaios preliminares, utilizando como organismos teste *L. sativa*

Percolado	28	56	84	112	140	168	196	224	252	280	308	336
C	Tóxico	Tóxico	Tóxico	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
SPC	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
SCC	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT

Teste t de Student $\alpha < 0,05$; Tóxico – Toxicidade aguda; NT - Não tóxico; C: percolado da coluna de cinza de carvão; SPC: percolado da coluna de solo de Piracicaba com cinza de carvão; SCC: percolado da coluna de solo de Conchal/Araras com cinza de carvão.

Apenas os percolados 28, 56 e 84 provenientes da coluna de cinza de carvão (percolado C) apresentaram potencial para causar efeito tóxico à germinação das sementes de *L. sativa* (TAB.8). Isso indica que as substâncias tóxicas presentes na cinza de carvão foram mais lixiviadas pela coluna de cinza de carvão no período inicial de percolação.

Os percolados das colunas de solo com cinza de carvão SPC e SCC (TAB.8) não apresentaram efeito tóxico sobre a germinação de sementes de *L. sativa* ao longo de 336 dias de percolação, o que indica que possivelmente as

substâncias tóxicas foram retidas nos solos das colunas, de modo que, os dois tipos de solos utilizados nas colunas agiram como um filtro. Entretanto, o fato dos percolados SPC e SCC não causarem toxicidade aguda nos organismos não indica necessariamente que a concentração das substâncias presentes nos percolados não possa causar toxicidade crônica a estes mesmos organismos teste, mas no presente trabalho a toxicidade crônica não foi avaliada nestes percolados.

Os resultados obtidos para os percolados SPC e SCC das colunas de solo (TAB.8) não foram coerentes aos resultados observados no estudo realizado por Chapman et al. (2010) no qual foram reportados efeitos tóxicos à germinação de sementes de *L. sativa* quando avaliada a toxicidade dos lixiviados de solos contaminados com elementos tóxicos. Do mesmo modo, os resultados apresentados na TAB.8 também não foram coerentes aos reportados no estudo realizado por Cook et al. (2002) no qual foi observado efeitos tóxicos ao desenvolvimento das radículas de *L. sativa* no primeiro lixiviado de solo contaminado com hidrocarbonetos e elementos tóxicos. Entretanto, nesse mesmo estudo não foi observado efeitos adversos aos demais lixiviados de solo contaminado, assim como no presente trabalho.

A diferença entre os resultados obtidos na literatura e no presente trabalho pode estar relacionada com a composição química, concentração dos compostos químicos e com os parâmetros físicos e químicos dos solos e lixiviados dos solos.

5.1.1.2. Ensaios definitivos

Os ensaios definitivos de germinação e desenvolvimento das radículas de *L. sativa* foram realizados com os percolados que apresentaram toxicidade aguda de acordo com os ensaios preliminares (percolados 28, 56 e 84 da coluna de cinza de carvão) descritos no item 5.1.1.1. Os resultados obtidos nos ensaios definitivos foram utilizados para calcular a concentração de inibição ($CI_{50(120h)}$), a concentração de efeito não observado (CENO), concentração de efeito observado (CEO) e o índice de germinação (IG).

A $CI50_{(120h)}$ foi calculada tomando-se como base as sementes germinadas nos ensaios de germinação e desenvolvimento das radículas de *L. sativa* por meio do programa estatístico *Trimmed Spearman-Kärber*, conforme descrito no capítulo de materiais e métodos no item 4.4.2. Na FIG.15 foram apresentados os valores obtidos para a $CI50_{(120h)}$ para os percolados 28, 56 e 84 da coluna de cinza de carvão.

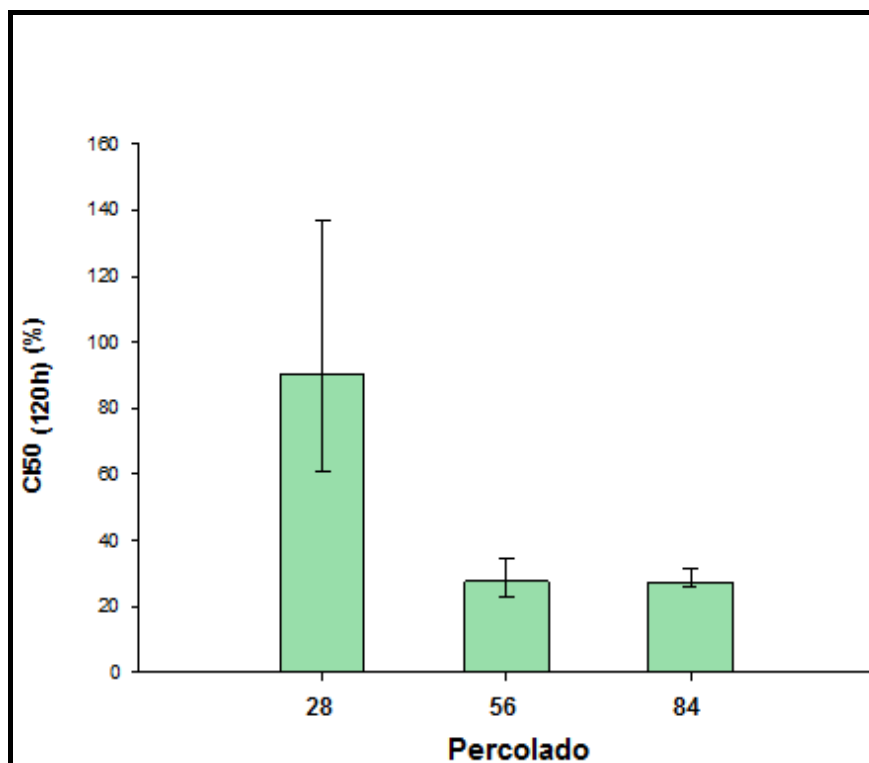


FIGURA 15 – $CI50_{(120h)}$ dos percolados da coluna de cinza de carvão empregando como organismo teste sementes de *L. sativa* ┆: intervalo de confiança

Esses valores são aceitáveis uma vez que a carta controle estabelecida para os ensaios de germinação e desenvolvimento das radículas de *L. sativa* (Apêndice A) foi satisfatória, pois os valores de $CI50_{(120h)}$ da carta apresentaram-se dentro de uma faixa considerada aceitável.

Para os percolados 28, 56 e 84 da coluna de cinza de carvão foram observados valores médios de $CI50_{(120h)}$ de 90,6, 27,6 e 31,1% (FIG.15), respectivamente.

De acordo com os valores médios obtidos para $CI50_{(120h)}$ o percolado 28 da coluna de cinza de carvão apresentou o menor potencial para causar efeito tóxico à germinação das sementes de *L. sativa*, ao passo que os percolados 56 e 84 da mesma coluna de cinza de carvão apresentaram maior potencial tóxico à germinação das sementes.

Os valores médios de CENO e CEO para os percolados 28, 56 e 84 da coluna de cinza de carvão foram calculados tomando-se como base o comprimento das radículas da *L. sativa* por meio do programa Toxstat 3.5, conforme descrito em materiais e métodos, item 4.4.2. Os valores médios de CENO e CEO para estes percolados foram 12,5% e 25%, respectivamente. Isso indica que estes percolados com concentrações acima ou igual a 25% apresentam potencial para causar efeitos subletais sobre o desenvolvimento das radículas.

O índice de germinação (IG) foi calculado por meio da equação 1 descrita no capítulo de materiais e métodos no item 4.4.2., tomando-se como base tanto os dados de germinação das sementes quanto os de comprimento das radículas para os percolados 28, 56 e 84 da coluna de cinza de carvão. Nas FIG.16, FIG.17 e FIG.18 foram apresentados os valores obtidos para o índice de germinação (IG) dos percolados 28, 56 e 84, respectivamente.

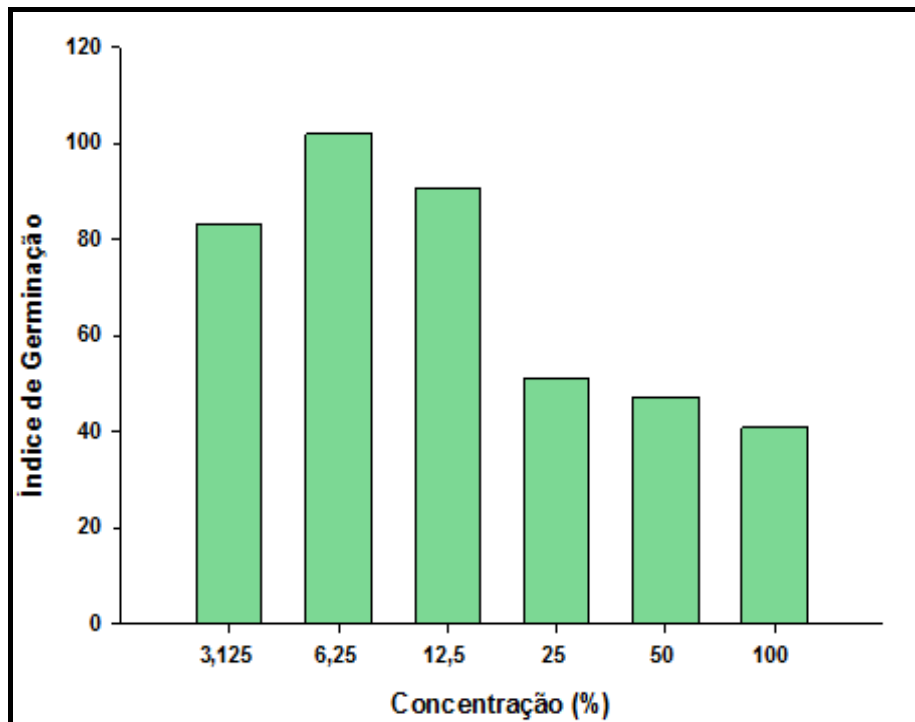


FIGURA 16 - Índice de germinação (IG) do percolado 28 da coluna de cinza de carvão

O percolado 28 da coluna de cinza de carvão (FIG.16) nas concentrações de 3,125, 6,25 e 12,5% apresentou índices de germinação mais altos que variaram de 83,0 a 101,9. Por outro lado, nas concentrações de 25 a 100% do percolado foram observados os índices de germinação mais baixos, variando de 40,8 a 51,0.

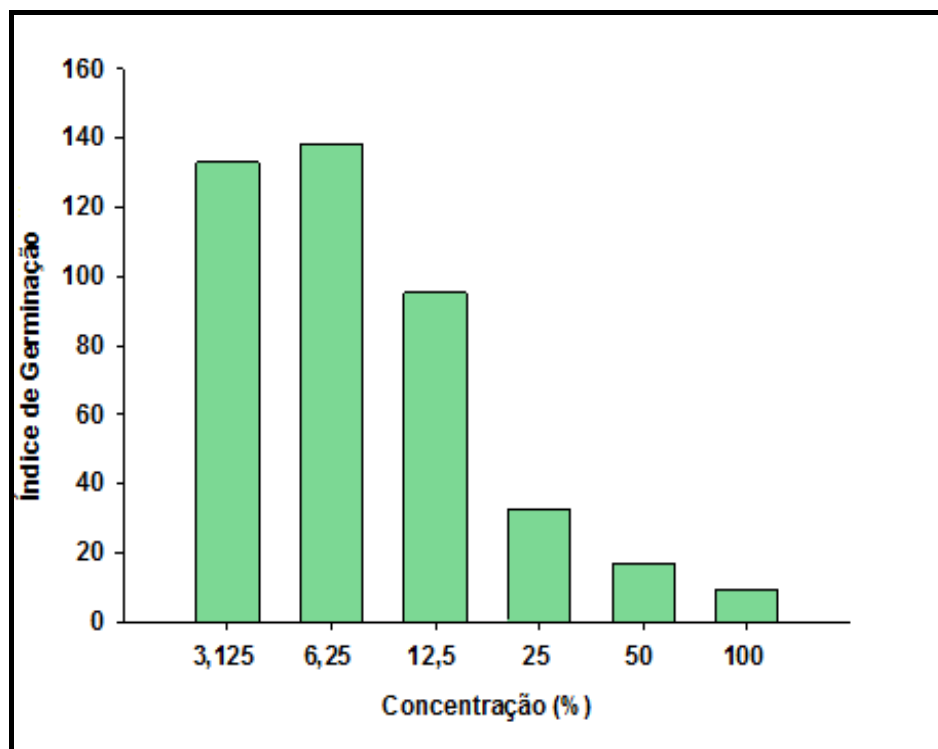


FIGURA 17 - Índice de germinação (IG) do percolado 56 da coluna de cinza de carvão

O percolado 56 da coluna de cinza de carvão (FIG.17) apresentou índices de germinação maiores nas concentrações de 3,125, 6,25 e 12,5% que variaram de 95,3 a 137,9, ao passo que as concentrações de 25 a 100% do mesmo percolado apresentaram índices de germinação mais baixos, os quais variaram entre 9,5 a 32,3.

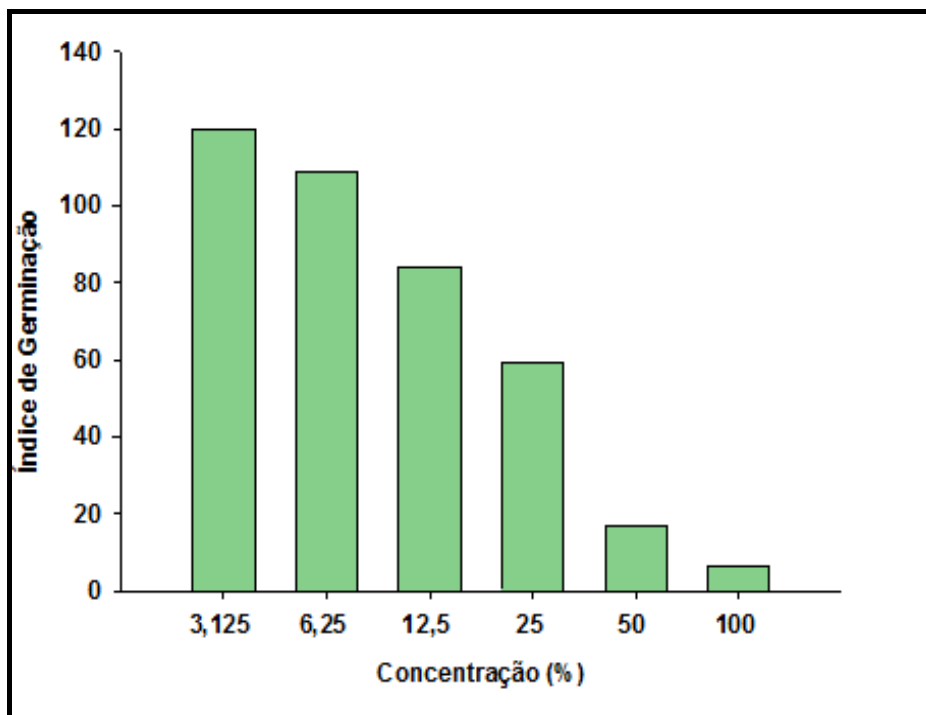


FIGURA 18 - Índice de germinação (IG) do percolado 84 da coluna de cinza de carvão

O percolado 84 da coluna de cinza de carvão (FIG.18) nas concentrações de 3,125, 6,25 e 12,5% apresentou os maiores índices de germinação que variaram de 84,2 a 120,0. Por outro lado, nas concentrações de 25, 50 e 100% deste mesmo percolado foram observados os menores índices de germinação, os quais variaram de 6,7 a 59,0.

Os valores obtidos para o IG nos percolados 28 (FIG.16), 56 (FIG.17) e 84 (FIG.18) da coluna de cinza de carvão nas concentrações 3,125, 6,25 e 12,5% foram maiores que 80. Isso mostra que tais percolados diluídos para as concentrações descritas anteriormente não apresentam potencial para causar danos sobre a germinação das sementes e desenvolvimento das radículas de *L. sativa*.

A diminuição do IG entre as concentrações 12,5% e 25% observada nos percolados 28 (FIG.16), 56 (FIG.17) e 84 (FIG.18) da coluna de cinza de carvão foi coerente com os valores de CENO (12,5%) e CEO (25%).

Nas concentrações 50% e 100% dos percolados da coluna de cinza de carvão os valores de IG foram 47,2 e 40,8 para o percolado 28 (FIG.16), 19,2 e 9,5 para o percolado 56 (FIG.17) e de 18,4 e 6,7 para o percolado 84 (FIG.18), respectivamente. Isso mostra que o percolado 28 apresentou os maiores valores de IG (47,2 e 40,8), ou seja, apresentou menor potencial para causar danos sobre a germinação do organismo teste *L. sativa*. Por outro lado, os percolados 56 e 84 que apresentaram os menores valores de IG (19,2 e 9,5 e 18,4 e 6,7) demonstraram um maior potencial para causar danos à germinação das sementes de *L. sativa*. Isso é coerente com os valores de $CI50_{(120)}$ para os percolados 28, 56 e 84 da coluna de cinza de carvão (FIG.15).

5.1.1.3. Desenvolvimento das radículas de *Lactuca sativa*

A média do comprimento das radículas das sementes germinadas nos percolados C, SPC e SCC e na água deionizada (controle negativo) foi determinada com os resultados obtidos nos ensaios preliminares e definitivos para avaliar o desenvolvimento das radículas. Na TAB.9 foram apresentadas as médias obtidas nos ensaios preliminares.

TABELA 9 - Comprimento médio das radículas das sementes germinadas nos percolados C, SPC e SCC e na água deionizada obtida nos ensaios preliminares

Percolado	Comprimento das radículas (cm)							
	C		SPC		SCC		Água deionizada	
	m±s	sr (%)	m±s	sr (%)	m±s	sr (%)	m±s	sr (%)
28	1,5 ± 0,4	26,3	3,2 ± 0,9	29,1	2,5 ± 0,7	28,0	2,4 ± 1,1	44,7
56	1,2 ± 0,3	26,6	2,9 ± 0,9	31,7	2,3 ± 0,6	25,9	2,8 ± 0,7	23,2
84	1,0 ± 0,6	58,7	2,5 ± 0,9	36,3	2,3 ± 1,4	59,2	2,7 ± 0,9	32,2
112	1,5 ± 0,4	22,7	2,4 ± 0,6	29,9	2,6 ± 0,5	48,2	2,3 ± 0,5	22,3
140	1,8 ± 0,4	22,7	3,5 ± 1,0	20,9	3,0 ± 1,4	48,2	2,3 ± 0,8	32,3
168	1,8 ± 0,4	20,2	3,4 ± 0,7	22,4	2,6 ± 0,5	21,6	2,4 ± 0,5	19,2
196	1,6 ± 0,3	17,5	2,8 ± 0,7	29,8	2,7 ± 0,5	19,7	2,3 ± 0,5	22,2
224	1,8 ± 0,4	21,3	2,7 ± 0,8	29,2	2,4 ± 0,8	33,1	2,5 ± 0,9	37,4
252	1,3 ± 0,4	31,3	3,3 ± 0,9	26,3	3,5 ± 0,6	23,7	2,3 ± 0,5	22,2
280	1,5 ± 0,6	36,7	3,3 ± 1,0	29,5	2,9 ± 0,8	26,4	2,6 ± 0,8	29,7
308	1,3 ± 0,4	30,7	2,4 ± 0,7	27,2	2,7 ± 0,7	23,9	2,7 ± 0,7	25,5
336	1,5 ± 1,1	72,3	3,4 ± 0,5	12,7	3,2 ± 0,8	25,6	2,8 ± 0,7	23,2

m±s: média ± desvio padrão; sr: desvio padrão relativo

O valor médio obtido para o comprimento das radículas ao longo dos ensaios foi de 2,5 cm para a água deionizada e para os percolados C, SPC e SCC os valores médios obtidos foram de 1,5, 3,0 e 2,7cm, respectivamente. Esses valores indicam que houve uma diferença no desenvolvimento das radículas entre a água deionizada e os percolados. Para avaliar esta diferença foi realizado o teste t com um nível de significância de 0,05. Os percolados C e SPC apresentaram diferença significativa ao passo que o percolado SCC não, ou seja, somente os percolados C e SPC causaram uma alteração no comprimento das radículas das sementes de *L. sativa*.

A diferença significativa entre o percolado C e a água deionizada representa que este percolado apresentou potencial para causar efeitos adversos ao desenvolvimento das radículas das sementes de *L. sativa*, uma vez que a média do comprimento das radículas (1,5 cm) no percolado C foi

menor do que a média (2,5 cm) na água deionizada. Isto é coerente com os resultados de toxicidade do percolado C obtidos para a germinação das sementes nos ensaios preliminares (TAB.8).

Por outro lado, também foi observada diferença significativa no comprimento das radículas entre os percolados da coluna de solo de Piracicaba com cinza de carvão (percolado SPC) e a água deionizada, mas a média do comprimento das radículas (3,0 cm) no percolado SPC foi maior do que a média (2,5 cm) na água deionizada.

Uma vez que os parâmetros químicos dos percolados podem estar relacionados com as alterações dos comprimentos das radículas das sementes de *L. sativa* os valores de concentração dos elementos (FIG.19 e FIG.20), ânions (FIG.21), carbono (FIG.22) e pH (FIG.23) dos percolados das colunas de solos SCC e SPC obtidos nos estudos de Lange (2012) e Silva (2013), respectivamente, foram apresentados.

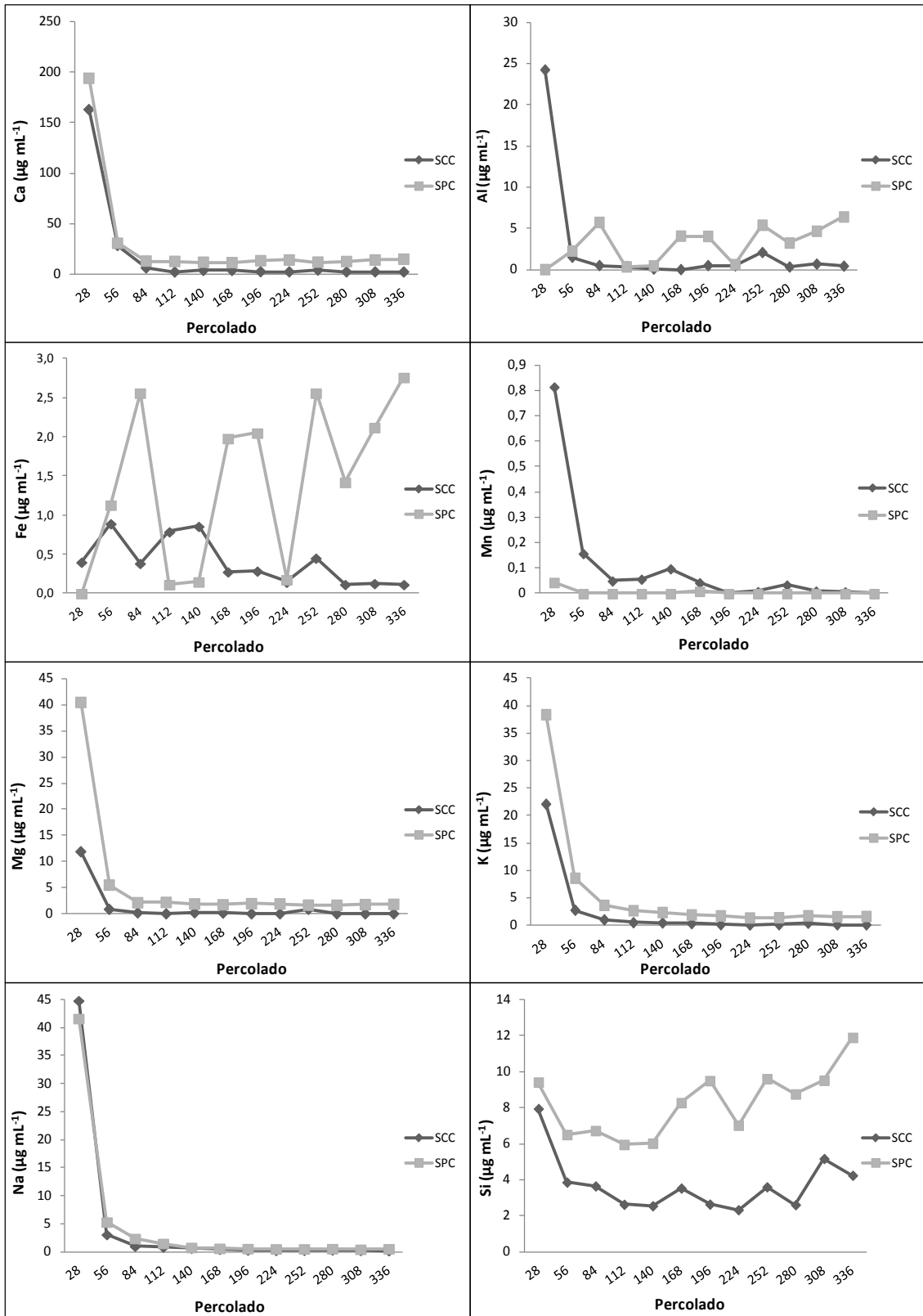


FIGURA 19 – Concentração dos elementos majoritários nos percolados SCC e SPC

Fonte: adaptada de Lange (2012) e Silva (2013)

A concentração dos elementos Ca, K e Na pouco variou entre os percolados das colunas SCC e SPC (FIG.19). A concentração do Mg no percolado 28 da coluna SPC foi maior que a da coluna SCC (FIG.19) e a do Mn foi maior nos percolados 28 e 56 da coluna SPC. Isso mostra que os elementos essenciais Ca, K, Mn e Mg para o desenvolvimento das plantas (Faquim, 1997) provavelmente não influenciaram no maior tamanho das radículas nos percolados SPC em relação aos percolados SCC.

A maior parte da concentração dos elementos Al e Fe nos percolados SPC (FIG.19) foi maior que a dos percolados SCC. A absorção do Al é considerada benéfica para planta, entretanto existem evidências de que este elemento em dadas concentrações passa a ser tóxico (Furlani, 2004) e o Fe é essencial para o desenvolvimento da planta (Faquin, 1997). A concentração do Si nos percolados SPC foi maior que a nos percolados SCC (FIG.19) ao longo dos 336 dias de percolação das colunas. A absorção do Si é considerada benéfica para a planta, pois para esta absorção é atribuída uma maior resistência a estresses bióticos e abióticos, tais como, deficiência hídrica, doenças causadas por fungos e inibição da absorção de outros elementos potencialmente tóxicos a planta (EMBRAPA 2013). Sendo assim, os elementos Al, Fe e Si poderiam ter contribuído para o maior tamanho das radículas nos percolados SPC em relação aos percolados SCC.

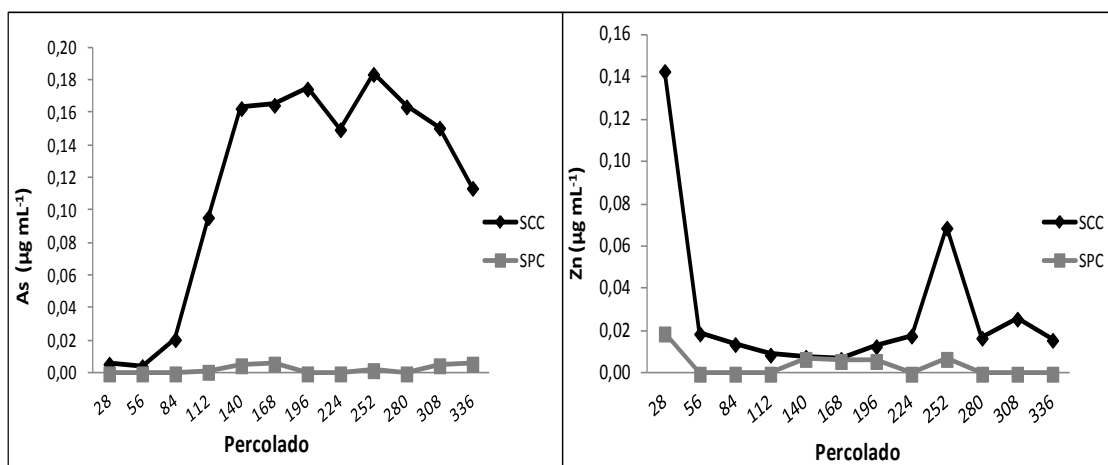


FIGURA 20 – Concentração dos elementos As e Zn nos percolados SCC e SPC

Fonte: adaptada de Lange (2012) e Silva (2013)

A concentração do As foi maior nos percolados SCC do que nos percolados SPC e a concentração de Zn foi maior nos percolados 28 e 252 da coluna SCC do que nos percolados SPC. De um modo geral o As é considerado um elemento tóxico para a planta (McBride, 1994) e o Zn essencial para o desenvolvimento da planta, mas pode ser tóxico dependendo de sua concentração (Faquin, 1997; Furlani, 2004). Como a concentração do As foi maior nos percolados SCC e a concentração de Zn foi baixa (FIG.20) e variou pouco nos percolados SCC e SPC ao longo de 336 dias de percolação das colunas, provavelmente estes elementos, As e Zn, não contribuíram para o maior tamanho das radículas nos percolados SPC.

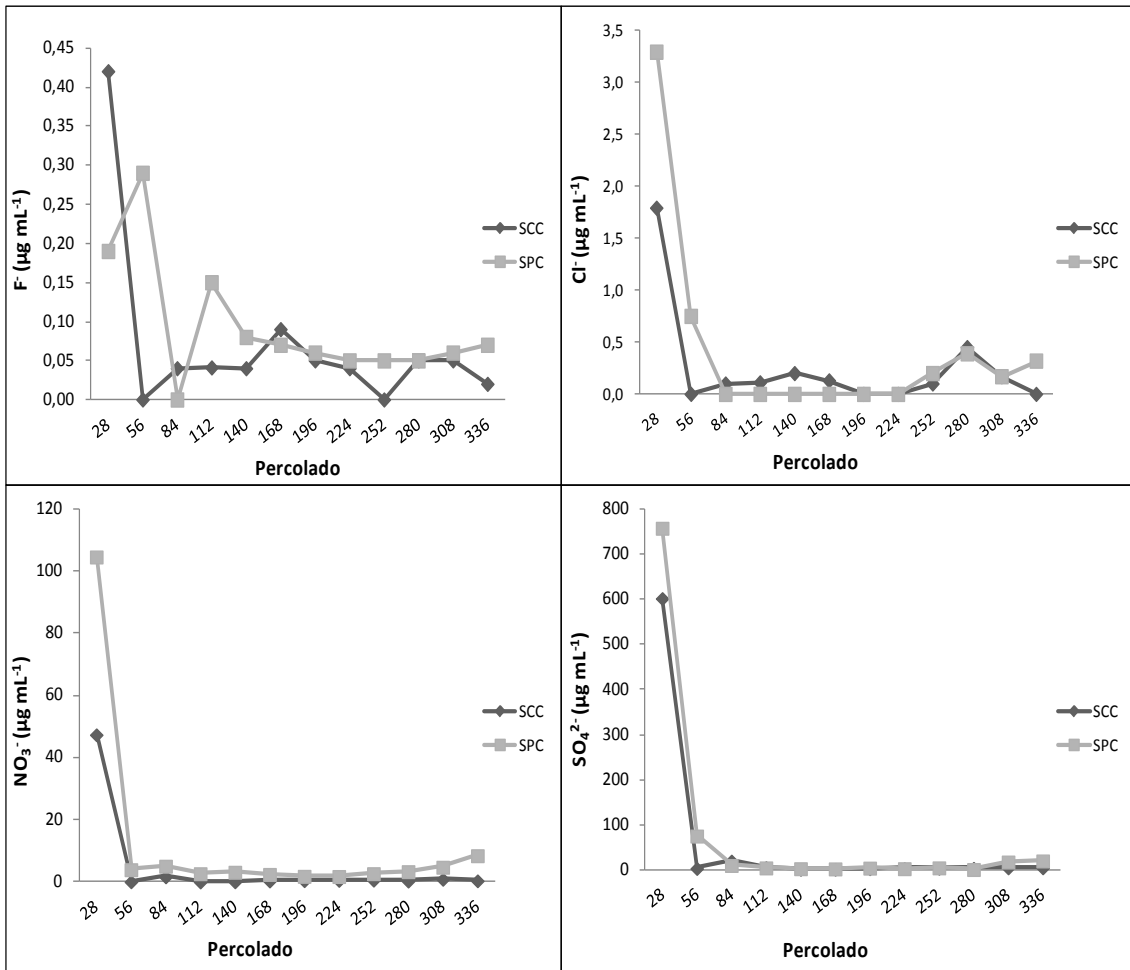


FIGURA 21 – Concentração dos ânions nos percolados SCC e SPC

Fonte: adaptada de Lange (2012) e Silva (2013)

De um modo geral, a concentração dos ânions fluoreto, cloreto, sulfato e nitrato variou pouco ao longo de 336 dias de percolação das colunas (FIG.21). Isso mostra que provavelmente esses ânions não contribuíram para o maior tamanho das radículas nos percolados SPC em relação aos percolados SCC.

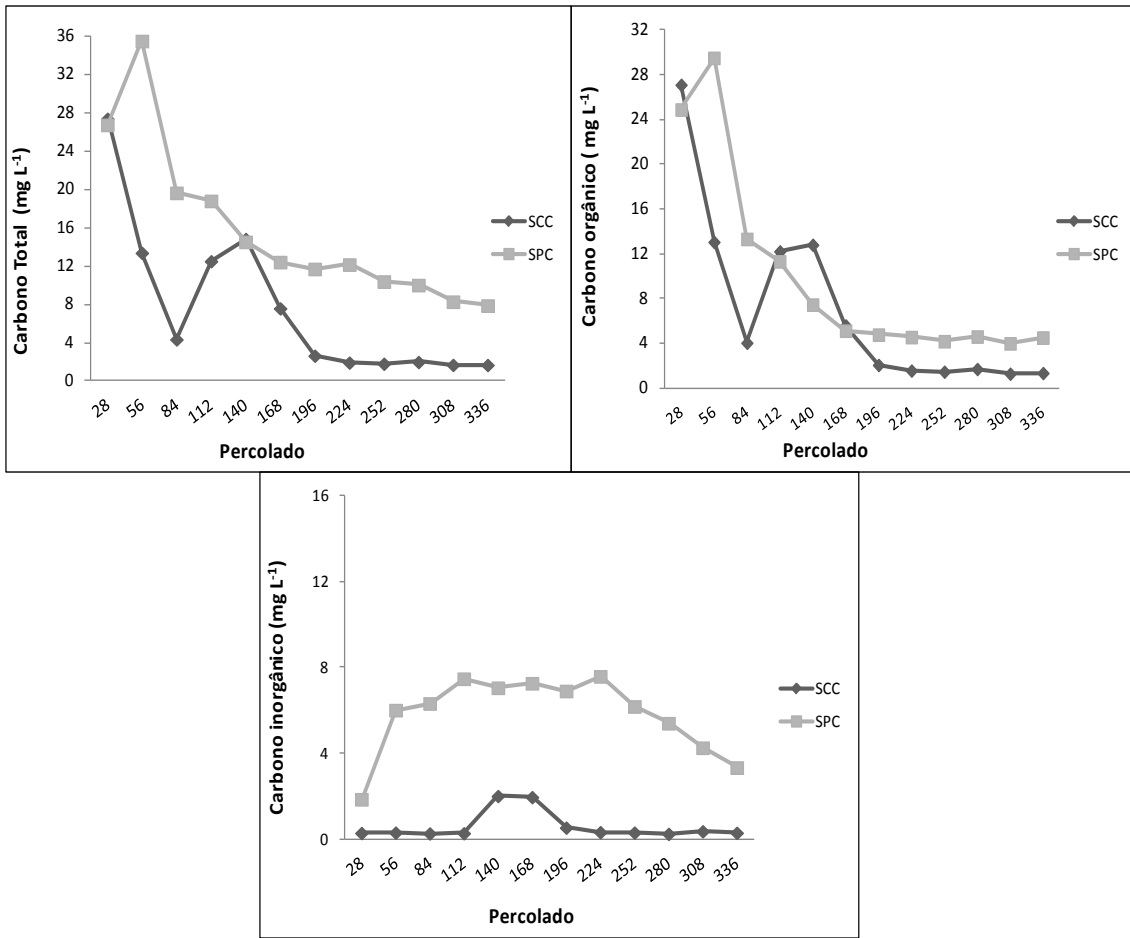


FIGURA 22 – Concentração de carbono orgânico, carbono inorgânico e carbono total nos percolados SCC e SPC

Fonte: adaptada de Lange (2012) e Silva (2013)

De acordo com a FIG.22 a concentração de carbono total e carbono inorgânico no percolado SPC foi maior ao longo dos 336 dias de percolação das colunas quando comparado com o percolado SCC. De um modo geral, a concentração do carbono orgânico também foi maior nos percolados SPC em relação aos percolados SCC, mas menos representativa que a concentração do carbono total inorgânico. De acordo com Ferreira (2007), a *L. sativa* é uma planta que em condições ideais requer solos ricos em matéria orgânica e nutrientes para seu desenvolvimento.

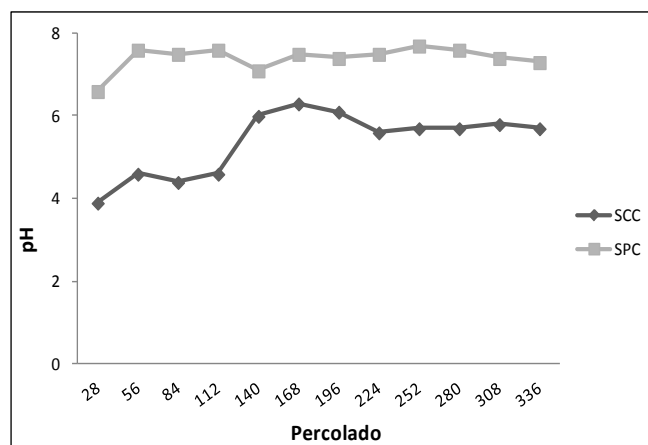


FIGURA 23 - pH dos percolados SPC e SCC

Fonte: adaptada de Lange (2012) e Silva (2013)

O valor do pH nos percolados SPC (de 6,6 a 7,7) foi maior que nos percolados SCC (de 3,9 a 6,3) (FIG.23). Segundo a Environmental Canada (2005), a faixa ideal de pH para a germinação de sementes *L. sativa* é de 6,0 a 8,0. Isso mostra que os valores de pH dos percolados SPC estão dentro da faixa ideal de pH para a germinação das sementes e isso poderia indicar que os percolados SPC favorecem o crescimento do tamanho das radículas.

O estímulo ao desenvolvimento das radículas de *L. sativa* observado no percolado SPC foi coerente com o observado no estudo realizado por Cook et al. (2002) no qual o crescimento de algas *S. capricornutum* foi estimulado nos lixiviados (pH entre 7,27 e 8,19) de solo contaminado com elementos tóxicos e hidrocarbonetos.

O desvio padrão relativo observado para os comprimentos das radículas nos percolados C, SPC, SCC e na água deionizada (TAB.9) apresentou-se relativamente alto variando de 17,3 a 72,3% nos percolados C, 12,7 a 36,3% nos percolados SPC, 19,7 a 59,2% nos percolados SCC e 19,2 a 44,7% na água deionizada demonstrando a não homogeneidade dos dados. Mas esta variabilidade foi semelhante entre os percolados e a água deionizada.

As médias do comprimento das radículas das sementes germinadas nos percolados 28, 56 e 84 da coluna de cinza de carvão e na água deionizada

(controle negativo) também foram determinadas nos ensaios definitivos para avaliar o desenvolvimento das radículas. Na TAB.10 foram apresentadas as médias do comprimento das radículas obtidas nos ensaios definitivos.

TABELA 10 - Comprimento médio das radículas das sementes germinadas nos percolados 28, 56 e 84 da coluna de cinza de carvão e na água deionizada obtida nos ensaios definitivos

		Comprimento das radículas (cm)					
		28		56		84	
		m±s	sr (%)	m±s	sr (%)	m±s	sr (%)
Concentração (%)	Percolado	28		56		84	
	3,125	2,0±0,5	25,06	3,1±0,9	29,35	3,4±0,8	22,38
	6,25	2,4±0,6	23,37	3,1±0,7	22,61	3,0±0,9	29,70
	12,5	2,2±0,5	22,31	2,5±0,7	27,97	2,8±0,8	27,82
	25	1,7±0,4	25,40	1,3±0,4	27,48	2,0±0,6	31,48
	50	1,6±0,5	30,32	1,2±0,4	38,26	1,4±0,3	23,71
	100	1,9±0,6	30,11	1,0±0,2	19,08	1,1±0,2	19,31
Água deionizada		2,3±0,5	20,94	2,2±0,6	27,52	2,8±0,7	25,59

m±s: média ± desvio padrão; sr: desvio padrão relativo

Os valores do comprimento das radículas dos percolados 28, 56 e 84 da coluna de cinza de carvão (TAB.10) foram comparados com os da água deionizada (controle negativo) por meio do teste t com um nível de significância de 0,05. Foram observadas diferenças significativas entre os percolados 28, 56 e 84 nas concentrações iguais ou acima de 25% e a água deionizada. Isso é coerente com o valor de CEO (25%) descrito no item 5.1.1.2, ou seja, estes percolados nas concentrações iguais ou acima de 25% apresentaram potencial para causar efeito sobre o desenvolvimento das radículas durante a exposição.

Para o percolado 56 da coluna de cinza de carvão nas concentrações 3,125% e 6,25% também foram observadas diferenças significativas quando comparado com a água deionizada, mostrando que as radículas nestes percolados cresceram mais que as na água deionizada.

5.1.2. Ensaios de toxicidade aguda com *Daphnia similis*

Os ensaios de toxicidade aguda com *D. similis* foram justificados no presente trabalho com base no texto descrito na revisão de literatura (itens 3.4.2, 3.4.4 e 3.5) por serem recomendados como ensaios exploratórios para avaliar lixiviados de solos e lixiviados de resíduos, padronizados no Brasil desde 2004 de acordo com a norma da ABNT NBR 12713 e por estudos que empregam *Daphnia* para a avaliação de toxicidade aguda em lixiviados de solo.

Os ensaios de toxicidade aguda com *D. similis* foram realizados para os percolados C, SPC e SCC conforme descrito no item 4.3.

5.1.2.1. Ensaios preliminares

Os ensaios preliminares foram realizados para determinar a toxicidade potencial dos percolados puros (concentração 100%) das colunas de cinza de carvão e de solos com cinza de carvão.

Para avaliar previamente a toxicidade ou não dos percolados C, SCC e SPC os percolados puros das colunas foram comparados à água para o cultivo de *D. similis* (controle negativo) por meio do teste t de Student com nível de significância 0,05, conforme descrito no item 4.4.1. Na TAB.11 foram apresentados os resultados obtidos nos ensaios preliminares de toxicidade aguda dos percolados C, SCC e SPC aos organismos teste *D. similis*.

TABELA 11 – Toxicidade dos percolados C, SCC e SPC (concentração 100%) obtida nos ensaios preliminares utilizando como organismos teste *D. similis*

Percolado	28	56	84	112	140	168	196	224	252	280	308	336
C	Tóxico	Tóxico	Tóxico	Tóxico	NT	Tóxico	NT	NT	NT	NT	NT	NT
SPC	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
SCC	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT

Teste t de Student $\alpha < 0,05$; Tóxico – Toxicidade aguda; NT - Não tóxico; C: percolado da coluna de cinza de carvão; SPC: percolado da coluna de solo de Piracicaba com cinza de carvão; SCC: percolado da coluna de solo de Conchal/Araras com cinza de carvão

Nos ensaios preliminares de toxicidade aguda foram observados efeitos tóxicos a mobilidade e/ou sobrevivência dos organismos teste expostos aos percolados 28, 56, 84, 112 e 168 da coluna de cinza de carvão (percolado C). Isso indica que as substâncias tóxicas presentes na cinza de carvão foram mais lixiviadas pela coluna de cinza de carvão na primeira metade do tempo de percolação.

Os percolados das colunas de solo com cinza de carvão SPC e SCC (TAB.11) não apresentaram potencial para causar efeitos tóxicos de imobilidade e/ou mortalidade dos organismos teste nos ensaios preliminares. Estes resultados indicam que as substâncias tóxicas lixiviadas da cinza de carvão foram retidas no solo das colunas. Assim como já foi descrito anteriormente no item 5.1.1.1, o fato dos percolados das colunas de solo com cinza de carvão não apresentarem potencial para causar toxicidade aguda a estes organismos não indica necessariamente que a concentração das substâncias presentes nestes percolados não possa causar toxicidade crônica a estes organismos, mas no presente trabalho a toxicidade crônica não foi avaliada para estes organismos.

Os resultados dos percolados das colunas de solo SPC e SCC obtidos no presente trabalho (TAB.11) foram coerentes aos observados no estudo realizado por Chapman et al. (2010) no qual os percolados de diferentes

tipos de solos contaminados com elementos tóxicos não apresentaram efeitos adversos aos organismos teste *D. magna* quando expostos a estes percolados.

5.1.2.2. Ensaios definitivos

Os ensaios definitivos de toxicidade aguda com *D. similis* foram realizados com os percolados que apresentaram potencial para causar efeitos tóxicos aos organismos teste (percolados da coluna de cinza de carvão 28, 56, 84, 112 e 168) nos ensaios preliminares descrito no item 5.1.2.1.

A concentração efetiva, $CE50_{(48h)}$, foi calculada tomando-se como base os dados de imobilidade e/ou mortalidade dos organismos teste por meio do método estatístico Trimmed Spearman-Kärber como descrito no capítulo de materiais e métodos, no item 4.4.2. Na FIG.24 foram apresentados os valores obtidos para $CE50_{(48h)}$ dos percolados 28, 56, 84, 112 e 168 da coluna de cinza de carvão.

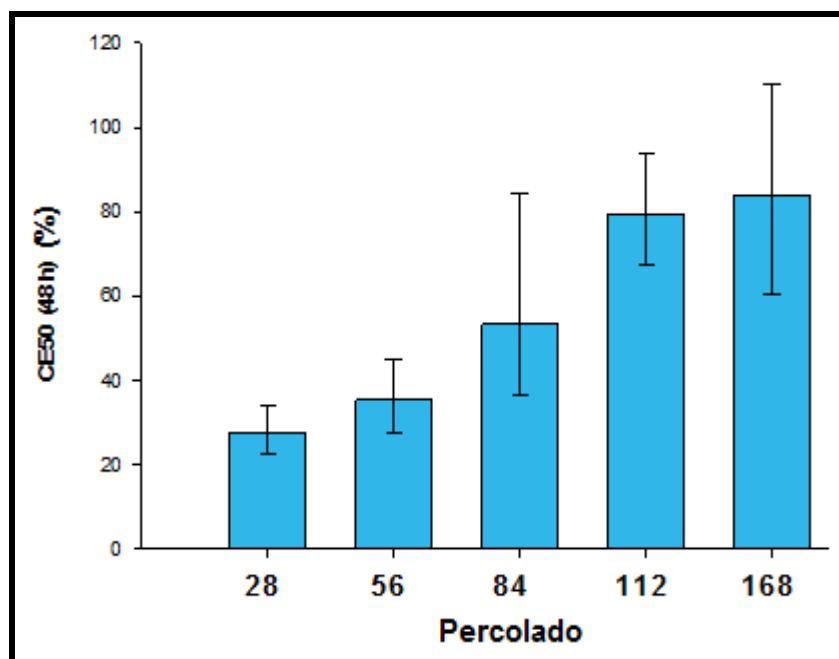


FIGURA 24 - $CE50_{(48h)}$ dos percolados da coluna de cinza de carvão utilizando como organismos teste *D. similis* —: intervalo de confiança

Esses valores são aceitáveis uma vez que a carta controle estabelecida nos ensaios de toxicidade aguda com *D. similis* (Apêndice B) foi satisfatória, pois os valores de $CE50_{(48h)}$ da carta apresentaram-se dentro de uma faixa considerada aceitável.

Foram observados para os percolados 28 e 56 da coluna de cinza de carvão os menores valores de $CE50_{(48h)}$, que foram 25,6 e 35,3%, respectivamente (FIG.24) quando comparados com os dos percolados 84, 112 e 168, que apresentaram valores de 55,3, 79,4 e 84,1%, respectivamente. Os resultados indicam que os percolados 28 e 56 da coluna de cinza de carvão apresentaram maior potencial tóxico.

Na FIG.25 foram apresentados os valores de concentração dos elementos nos percolados da coluna de cinza de carvão (percolado C) obtidos no estudo de Lange (2012).

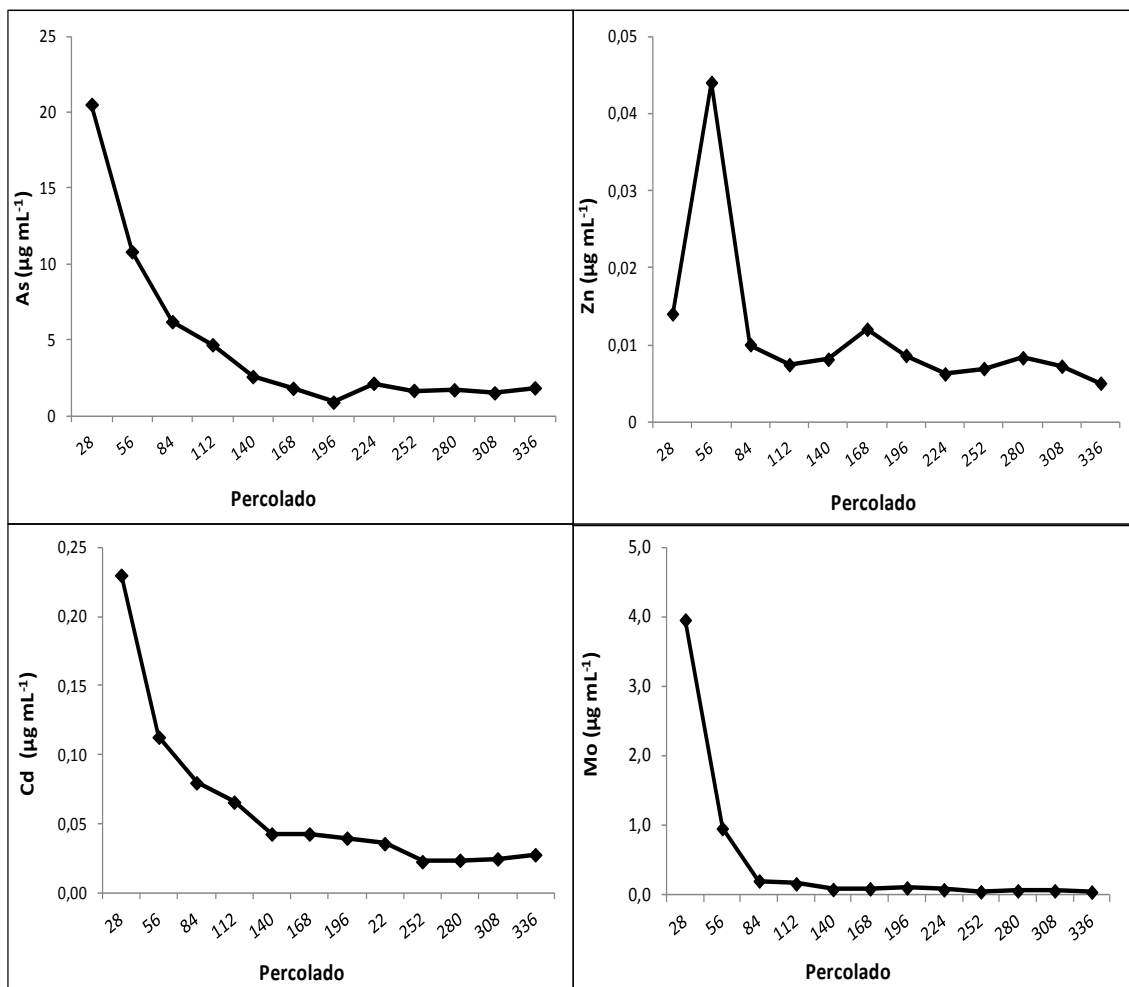


FIGURA 25 – Concentração dos elementos As, Zn, Cd e Mo no percolado C

Fonte: adaptada de Lange (2012)

A concentração dos elementos As, Cd e Mo, que são elementos considerados tóxicos, foi maior nos percolados 28 e 56 da coluna de cinza de carvão. Esse resultado foi coerente com o menor $CE50_{(48h)}$ nos percolados 28 e 56, ou seja, foi coerente com o maior efeito tóxico.

5.2. Coeficiente de correlação entre os valores obtidos para $CI50_{(120h)}$ e $CE50_{(48h)}$ e os parâmetros químicos dos percolados da coluna de cinza de carvão

Para avaliar a relação entre os valores obtidos para $CI50_{(120h)}$ (FIG.15) e $CE50_{(48h)}$ (FIG.24) com os parâmetros químicos (concentração dos elementos, ânions e carbono, pH e condutividade elétrica) dos percolados 28,

56 e 84 da coluna de cinza de carvão foi determinado o coeficiente de correlação de Pearson (r), uma vez que os dados analisados apresentaram normalidade, com um nível de significância 0,05. Na TAB.12 foram apresentados os valores obtidos de r.

TABELA 12 – Coeficiente de correlação (r) entre $CI50_{(120h)}$ e $CE50_{(48h)}$ e os parâmetros químicos dos percolados da coluna de cinza de carvão

Parâmetro	$CI50_{(120h)}$	$CE50_{(48h)}$
Período de percolação (dias)	-0,840	0,948
As ($mg L^{-1}$)	0,932	-0,908
Cd ($mg L^{-1}$)	0,966	-0,864
Mo ($mg L^{-1}$)	0,971	-0,780
Zn ($mg L^{-1}$)	-0,448	-0,531
Na ($mg L^{-1}$)	0,993	-0,705
K ($mg L^{-1}$)	0,992	0,714
Ca ($mg L^{-1}$)	0,993	-0,711
Mg ($mg L^{-1}$)	0,995	-0,691
Si ($mg L^{-1}$)	0,827	-0,354
Sulfato ($mg L^{-1}$)	0,997	-0,684
Nitrato ($mg L^{-1}$)	0,685	-0,469
Fluoreto ($mg L^{-1}$)	0,004	-0,917
Cloreto ($mg L^{-1}$)	0,902	-0,666
pH	-0,997	-0,028
Condutividade elétrica ($\mu S cm^{-1}$)	0,992	-0,723
Carbono total ($mg L^{-1}$)	0,659	-0,903
Carbono orgânico dissolvido ($mg L^{-1}$)	0,772	-0,866
Carbono inorgânico dissolvido ($mg L^{-1}$)	-0,324	-0,788

Os números em azul e vermelho são correlações significativas positivas e negativas, respectivamente.

Os valores de coeficiente de correlação (r) foram considerados significativos quando foram acima do valor crítico (0,95) para $n = 3$ e (0,87) para $n = 5$ para um nível de significância 0,05, de acordo com Larson et al. (2011).

Foram observados coeficientes de correlação positiva entre os valores obtidos para $CI50_{(120h)}$ e as concentrações dos elementos Na (0,993), K

(0,992), Ca (0,993), Mg (0,995), Mo (0,971), indicando que essas variáveis são diretamente proporcionais, ou seja, nas condições de estudo quanto maior foi o valor de $CI50_{(120h)}$ nos percolados 28, 56 e 84 da coluna de cinza de carvão (FIG.15) maior foi a concentração destes elementos (FIG.25 e FIG.26). Isso mostra que os macronutrientes K, Ca e Mg, o micronutriente Mo e o elemento benéfico Na são essenciais para a germinação e desenvolvimento das sementes de *L. sativa*.

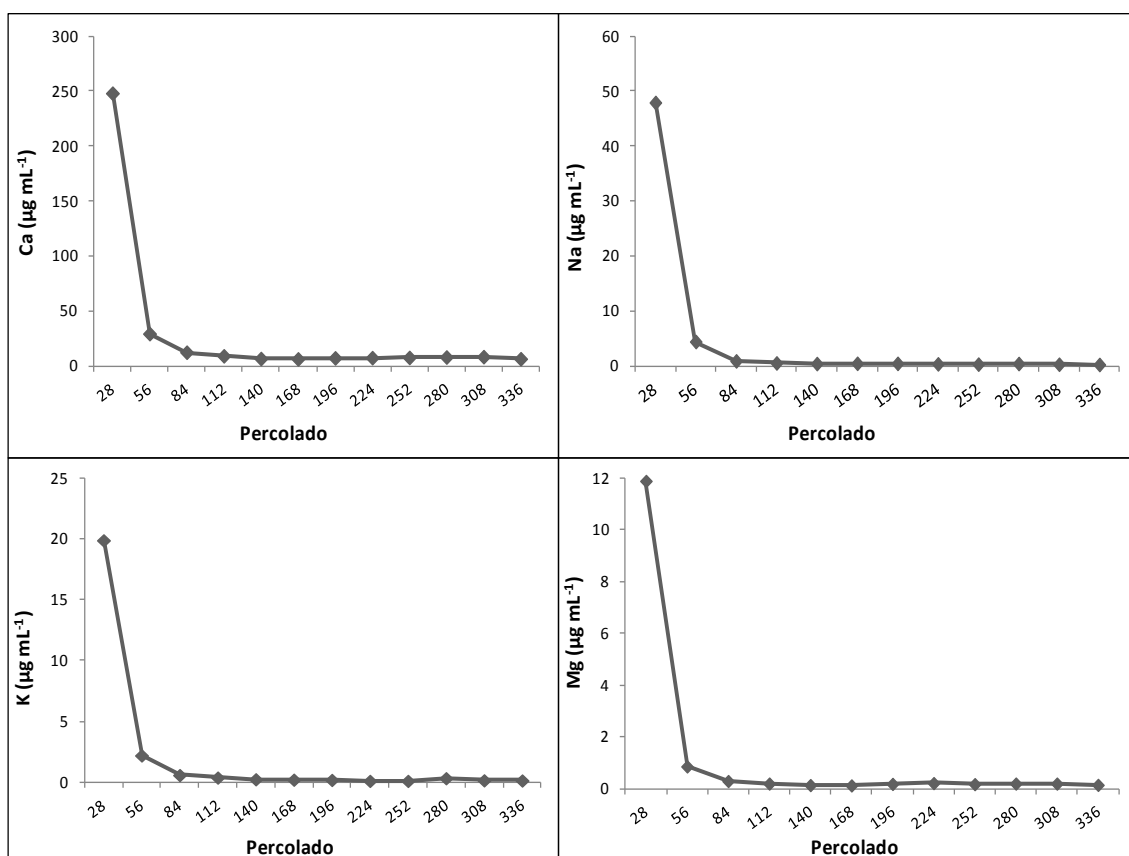


FIGURA 26 – Concentração dos elementos Na, Ca, K e Mg no percolado C

Fonte: adaptada de Lange (2012)

O Cd que é considerado um elemento tóxico para as plantas também apresentou uma correlação positiva (0,966) com os valores de $CI50_{(120h)}$. No percolado 28 o valor de $CI50_{(120h)}$ (FIG.15) e a concentração dos elementos essenciais (FIG.26) foram maiores que nos percolados 56 e 84, e os elementos essenciais poderiam prevalecer na absorção da planta por estarem em maior concentração no percolado quando comparado com o Cd. Por outro

lado, nos percolados 56 e 84 a concentração dos elementos essenciais, Na, K, Ca e Mg, diminuíram podendo favorecer a absorção do Cd e assim aumentar o efeito tóxico na planta.

Foram observados também coeficientes de correlação positiva entre os valores obtidos para $CI50_{(120h)}$ e a concentração do ânion sulfato (0,997), o que mostra que quanto maior o valor de $CI50_{(120h)}$ nos percolados 28, 56 e 84 da coluna de cinza de carvão (FIG.15) maior o valor de concentração de sulfato (FIG.27). Isso sugere que o sulfato foi um íon importante na germinação e desenvolvimento das sementes de *L. sativa*.

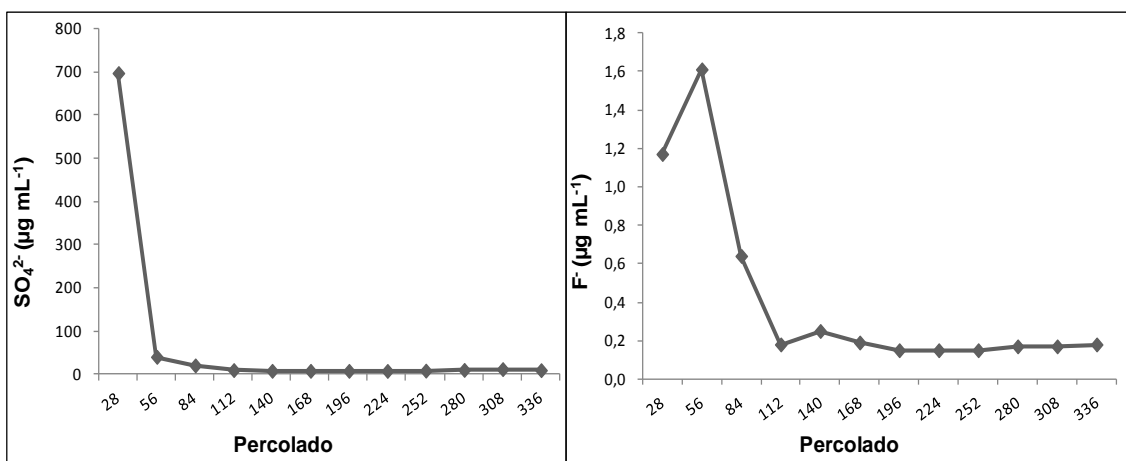


FIGURA 27 – Concentração dos ânions no percolado C

Fonte: adaptada de Lange (2012)

A condutividade elétrica também apresentou um coeficiente de correlação positiva (0,992) com os valores de $CI50_{(120h)}$. Essa correlação é coerente com as dos elementos essenciais Na, K, Ca, Mg e Mo e do SO_4^{2-} uma vez que a condutividade elétrica indica a quantidade de íons presentes nos percolados.

Foi observado coeficiente de correlação negativa apenas entre os valores obtidos para $CI50_{(120h)}$ e pH dos percolados (-0,997), indicando que essas variáveis são inversamente proporcionais, ou seja, nas condições de estudo quanto maior foi o valor de $CI50_{(120h)}$ nos percolados 28, 56 e 84 da coluna de cinza de carvão (FIG.15) menor foi o valor obtido para o pH (FIG.28).

Embora o pH dos percolados tenha apresentado uma correlação com a $CE50_{(120h)}$, provavelmente o pH não influenciou nos efeitos tóxicos observados para a germinação das radículas de *L. sativa*, pois, segundo a Environmental Canada (2005), a faixa ideal de pH para a germinação de sementes *L. sativa* é de 6,0 a 8,0, e o pH dos percolados estão dentro desta faixa variando entre 7,0 e 7,4 (FIG.28).

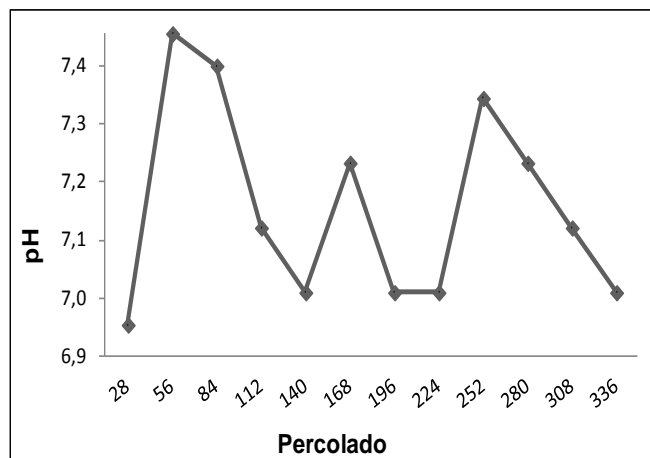


FIGURA 28 - pH do percolado C

Fonte: adaptado de Lange (2012)

Foi observado coeficiente de correlação positiva entre os valores de $CE50_{(48h)}$ e o tempo de percolação (0,948), o que sugere que quanto maior o valor de $CE50_{(48h)}$ nos percolados 28, 56, 84, 112 e 168 da coluna de cinza de carvão (FIG.24) maior foi o período de percolação. Isso indica que o percolado torna-se menos tóxico ao longo do período de percolação.

Foi observado coeficiente de correlação negativa apenas entre os valores obtidos para $CE50_{(48h)}$ e a concentração dos elementos As (-0,908) e Cd (-0,864), indicando que nas condições de estudo quanto maiores foram os valores de $CE50_{(48h)}$ nos percolados 28, 56, 84, 112 e 168 da coluna de cinza de carvão (FIG.24) menores foram os valores obtidos para concentração de As e Cd nestes percolados (FIG.25). Isso indica que a toxicidade observada nos percolados 28, 56, 84, 112 e 168 da coluna de cinza de carvão são decorrentes

da concentração de As e Cd nestes percolados, uma vez que estes elementos são considerados tóxicos e podem causar danos ambientais.

Foi observado também coeficiente de correlação negativa entre os valores obtidos para $CE50_{(48h)}$ e a concentração do ânion fluoreto (-0,917), carbono total (-0,903) e carbono orgânico dissolvido (-0,866), indicando que nas condições de estudo quanto maiores foram os valores de $CE50_{(48h)}$ nos percolados 28, 56, 84, 112 e 168 da coluna de cinza de carvão (FIG.24) menores foram os valores obtidos para a concentração do fluoreto (FIG.27), carbono total e carbono orgânico dissolvido nestes percolados (FIG.29). Isso sugere que a maior toxicidade, isto é, menor valor de $CE50_{(48h)}$ (FIG.24) observada esta associada a maior concentração de fluoreto (FIG.27), carbono total e carbono orgânico dissolvido nestes percolados da coluna de cinza de carvão (FIG.29). O fluoreto é um parâmetro inorgânico considerado para avaliação do padrão de qualidade de água para consumo (limite de concentração: $1,4 \text{ mg L}^{-1}$) e do lançamento de efluentes (limite de concentração: 10 mg L^{-1}) (CONAMA, 2005).

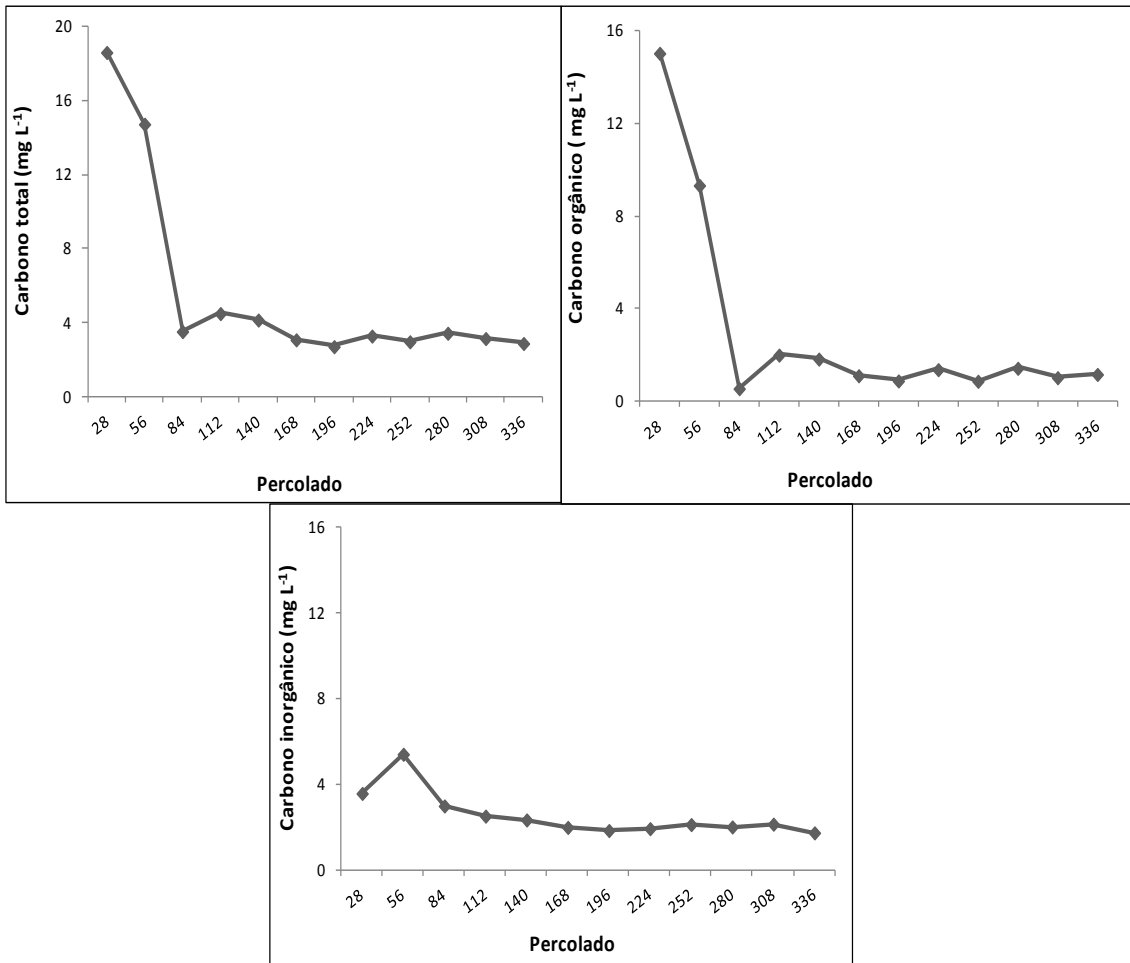


FIGURA 29 - Concentração de carbono orgânico, carbono inorgânico e carbono total no percolado C

Fonte: adaptada de Lange (2012)

As diferentes correlações observadas entre os parâmetros químicos e os valores de $CI_{50(120h)}$ e $CE_{50(48h)}$ nos percolados da coluna de cinza de carvão podem indicar diferentes sensibilidades que cada uma das espécies empregadas como organismos teste apresenta às substâncias que compõe os percolados analisados.

6. CONCLUSÕES

- Os percolados 28, 56 e 84 da coluna de cinza de carvão apresentaram potencial tóxico para causar inibição da germinação das sementes de *L. sativa*.

- Os percolados 28, 56, 84, 112 e 168 da coluna de cinza de carvão apresentaram toxicidade aguda dos organismos teste *D. similis*. A concentração de As, Cd e fluoreto contribuíram para a toxicidade destes percolados.

- O resultado do coeficiente de correlação positiva entre os valores de $CI_{50(120h)}$ e as concentrações dos elementos Mo, Na, K, Ca, Mg e do ânion sulfato indicaram que estes elementos e o ânion foram essenciais para a geminação das sementes de *L. sativa*.

- O pH apresentou coeficiente de correlação negativa com os valores de $CI_{50(120h)}$ nos percolados da coluna de cinza de carvão, mas provavelmente não influenciou na toxicidade dos percolados, pois o pH dos percolados estavam dentro da faixa ideal para a germinação das radículas de *L. sativa*.

- O resultado do coeficiente de correlação positiva entre os valores de $CE_{50(48h)}$ e o tempo de percolação da coluna de cinza de carvão indicou que o percolado torna-se menos tóxico ao longo do período de percolação.

- O resultado do coeficiente de correlação negativa entre os valores de $CE_{50(48h)}$ e a concentração do carbono total e carbono orgânico dissolvido indicaram que o carbono contribuiu para a toxicidade dos percolados da coluna de cinza quando utilizado a *D. similis* como organismo teste.

- Os percolados das colunas de solo com cinza de carvão (percolados SPC e SCC) não apresentaram potencial para causar efeitos adversos tanto à germinação das sementes e ao desenvolvimento das

radículas de *L. sativa*, bem como a mobilidade e/ou sobrevivência dos organismos teste *D. similis*. Isso indica que possivelmente as substâncias tóxicas lixiviadas da cinza de carvão foram retidas nos solos.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Carta controle de sensibilidade para *Lactuca sativa*

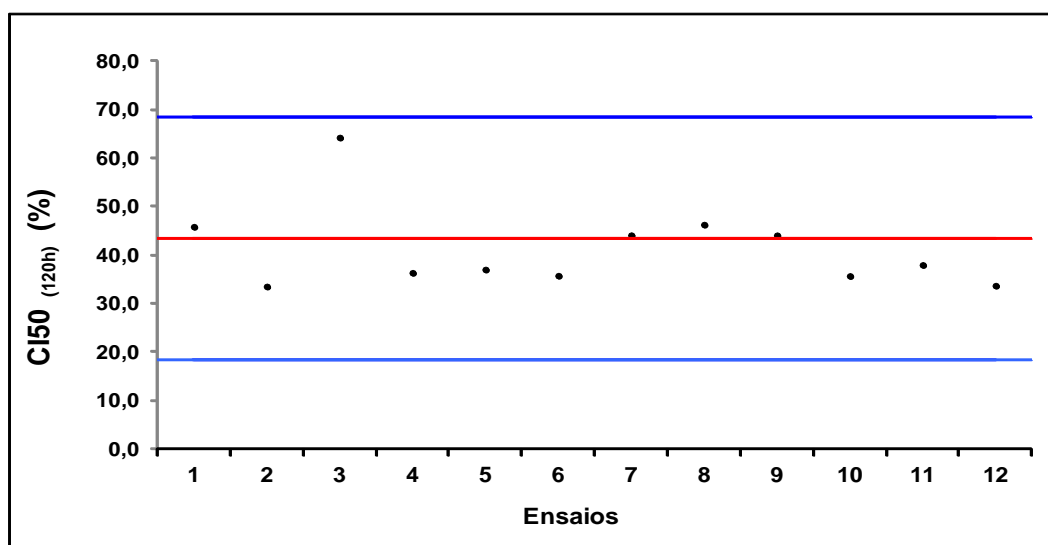
Organismos teste: *Lactuca sativa*

Método empregado: US EPA (1996), OECD (2003) e Sobrero et al. (2004)

Substância de referência: Sulfato de zinco ($ZnSO_4$)

Data	1/12/10	14/01/11	10/02/11	25/03/11	27/04/11	08/06/11
CI50 _(120h) (%)	45,72	33,41	64,11	36,24	36,91	35,64
Data	08/08/11	26/10/11	08/12/11	31/01/12	29/02/12	27/03/12
CI50 _(120h) (%)	43,98	46,16	43,97	35,58	37,86	33,59

Dados estatísticos obtidos na carta controle (%)				
Média	Desvio Padrão	Limite inferior	Limite superior	Coefficiente de Variação
43,28	12,52	18,24	68,23	26,70



APÊNDICE B - Carta controle de sensibilidade para *Daphnia similis*

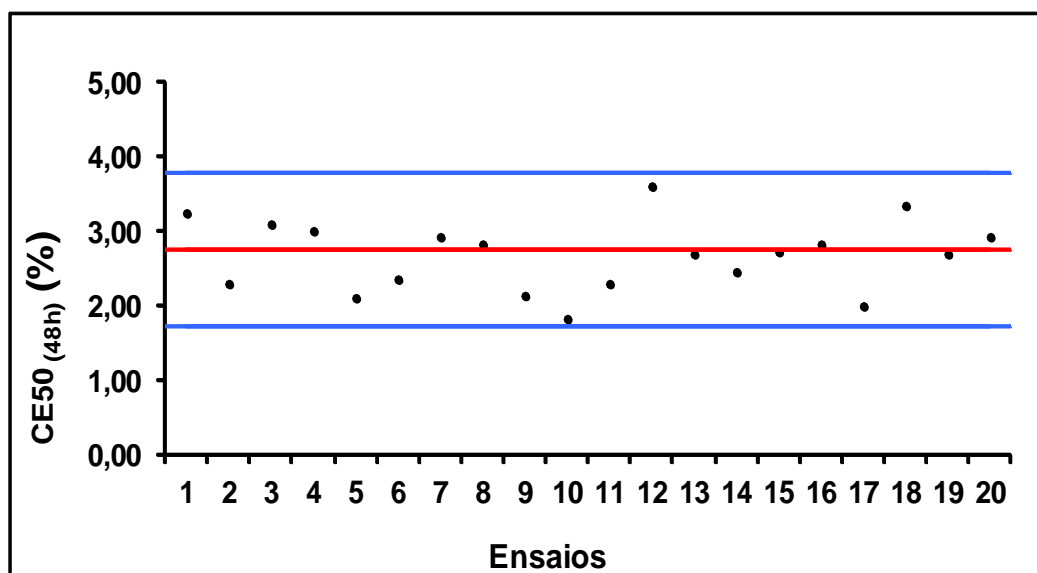
Organismos teste: *Daphnia similis*

Método empregado: ABNT NBR 12 713/ 2004

Substância de referência: Cloreto de sódio (NaCl)

Data	23/10/10	01/09/10	15/09/10	22/10/10	19/11/10	09/12/10	04/02/11	18/03/11	28/04/11	19/05/11
CE50 _(48h) (%)	3,25	2,30	3,10	3,01	2,11	2,36	2,93	2,83	2,14	1,83
Data	09/06/11	14/07/11	11/08/11	08/09/11	10/11/11	16/12/11	13/01/12	29/02/12	08/03/12	05/04/12
CE50 _(48h) (%)	2,30	3,61	2,70	2,46	2,73	2,83	2,00	3,35	2,70	2,93

Dados estatísticos obtidos na carta controle (%)				
Média	Desvio Padrão	Limite inferior	Limite superior	Coefficiente de Variação
2,75	0,47	1,72	3,78	45,66



APÊNDICE C - Paramêtros iniciais da água de cultivo utilizada nos ensaios com *D. similis*

Local da coleta: Salto, São Paulo

Parâmetros da água de cultivo					
Data	Lote	pH	OD (mg L ⁻¹)	Dureza (mg L CaCO ₃)	Condutividade (µS ₂₅ cm)
Outubro /2010	69	6,06	7,74	25	85,20
Novembro/2010	70	6,30	7,74	22	134,30
Dezembro/2010	71	6,30	7,93	20	97,60
Fevereiro/2011	73	nd	14,52	20	114,10
Março/2011	74	nd	6,78	18	61,10
Abril/2011	75	nd	7,38	18	76,40
Junho/2011	76	nd	8,10	20	92,60
Julho/2011	77	nd	8,00	20	76,50
Agosto/2011	78	nd	5,27	26	82,90
Setembro/2011	79	5,00	8,70	17	82,30
Outubro/2011	80	6,85	8,28	23	89,80
Novembro/2011	81	6,69	8,19	20	104,50
Dezembro/2011	82	6,86	8,04	20	153,80
Janeiro /2012	83	7,50	nd	20	137,10
Março/2012	84	6,82	nd	20	79,20
Abril/2012	85	7,50	nd	20	139,20
Mai/2012	86	7,43	nd	20	147,80

nd – não determinado

APÊNDICE D – Dados estatísticos para calcular os valores de $CI_{50(120h)}$ dos percolados 28, 56 e 84 da coluna de cinza de carvão nos ensaios definitivos com sementes de *L. sativa*

Percolado 28

```

ENTER THE NUMBER OF MORTALITIES AT EACH CONCENTRATION:
7
4
7
26
28
42

WOULD YOU LIKE THE AUTOMATIC TRIM CALCULATION<Y/N>? Y

DATE: 09 02 12          TEST NUMBER: 1          DURATION: 120 HOURS
CHEMICAL: PERCOLADO DA COLUMA DE CINZA DE CARVAO DE 28 D SPECIES: LACTUCA SAT
IUA

RAW DATA:
CONCENTRATION(<%>)      3.12    6.25    12.50   25.00   50.00  100.00
NUMBER EXPOSED:         80      80      80      80      80     80
MORTALITIES:             7        4        7       26      28     42
SPEARMAN-KARBER TRIM:           47.50%

SPEARMAN-KARBER ESTIMATES:  EC50:           90.57
                          95% LOWER CONFIDENCE:       61.70
                          95% UPPER CONFIDENCE:       132.96

NOTE:  MORTALITY PROPORTIONS WERE NOT MONOTONICALLY INCREASING.
        ADJUSTMENTS WERE MADE PRIOR TO SPEARMAN-KARBER ESTIMATION.
    
```

Percolado 56

```

ENTER THE NUMBER OF MORTALITIES AT EACH CONCENTRATION:
10
8
18
40
56
64

WOULD YOU LIKE THE AUTOMATIC TRIM CALCULATION<Y/N>? Y

DATE: 01 03 12          TEST NUMBER: 1          DURATION: 120 HOURS
CHEMICAL: PERCOLADO DA COLUMA DE CINZA DE CARVAO DE 56 D SPECIES: LACTUCA SAT
IUA

RAW DATA:
CONCENTRATION(<%>)      3.12    6.25    12.50   25.00   50.00  100.00
NUMBER EXPOSED:         80      80      80      80      80     80
MORTALITIES:            10       8       18      40      56     64
SPEARMAN-KARBER TRIM:           20.00%

SPEARMAN-KARBER ESTIMATES:  EC50:           27.57
                          95% LOWER CONFIDENCE:       22.63
                          95% UPPER CONFIDENCE:       33.59

NOTE:  MORTALITY PROPORTIONS WERE NOT MONOTONICALLY INCREASING.
        ADJUSTMENTS WERE MADE PRIOR TO SPEARMAN-KARBER ESTIMATION.
    
```


APÊNDICE D (continuação)

Percolado 84

```
ENTER THE NUMBER OF MORTALITIES AT EACH CONCENTRATION:  
11  
10  
22  
24  
57  
68  
  
WOULD YOU LIKE THE AUTOMATIC TRIM CALCULATION(Y/N)? Y  
  
DATE: 08 03 12          TEST NUMBER: 1          DURATION: 120 HOURS  
CHEMICAL: PERCOLADO DA COLUNA DE CINZA DE CARUAO 84 DIAS SPECIES: LACTUCA SAT  
IVA  
  
RAW DATA:  
CONCENTRATION(%)          3.12    6.25   12.50   25.00   50.00  100.00  
NUMBER EXPOSED:           80     80     80     80     80     80  
MORTALITIES:              11     10     22     24     57     68  
SPEARMAN-KARBER TRIM:           15.00%  
  
SPEARMAN-KARBER ESTIMATES:  EC50:           31.10  
                          95% LOWER CONFIDENCE:  25.99  
                          95% UPPER CONFIDENCE:   37.23  
  
NOTE: MORTALITY PROPORTIONS WERE NOT MONOTONICALLY INCREASING.  
ADJUSTMENTS WERE MADE PRIOR TO SPEARMAN-KARBER ESTIMATION.
```

APÊNDICE E - Dados do Teste t para o desenvolvimento das radículas nos percolados C, SCC e SPC nos ensaios preliminares e definitivos com *L. sativa*

Ensaio preliminares

Percolado SPC

```

PERCOLADO SOLO PIRACICABA COM CINZA DE CARUAO
File: PERCOLADO SPC          Transform: NO TRANSFORMATION
Chi-square test for normality: actual and expected frequencies
-----
INTERVAL    <-1.5    -1.5 to <-0.5    -0.5 to 0.5    >0.5 to 1.5    >1.5
-----
EXPECTED    1.608      5.808      9.168      5.808      1.608
OBSERVED    0          10         4          10         0
-----
Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic = 12.1805
Table Chi-Square value (alpha = 0.01) = 13.277
Data PASS normality test. Continue analysis.
    
```

```

PERCOLADO SOLO PIRACICABA COM CINZA DE CARUAO
File: PERCOLADO SPC          Transform: NO TRANSFORMATION
Shapiro - Wilk's test for normality
-----
D = 2.346
W = 0.946
Critical W (P = 0.05) (n = 24) = 0.916
Critical W (P = 0.01) (n = 24) = 0.884
-----
Data PASS normality test at P=0.01 level. Continue analysis.
    
```

```

PERCOLADO SOLO PIRACICABA COM CINZA DE CARUAO
File: PERCOLADO SPC          Transform: NO TRANSFORMATION
F-Test for equality of two variances
-----
GROUP    IDENTIFICATION    VARIANCE    F
-----
1        CONTROLE          0.041        4.223
2        SPC                0.172
-----
Critical F = 5.85 (P=0.01, 10, 10)
Since F <= Critical F, FAIL TO REJECT Ho: Equal Variances.
    
```

TOXSTAT		t-Test Results	
PERCOLADO SOLO PIRACICABA COM CINZA DE CARUAO			
File: PERCOLADO SPC Transform: NO TRANSFORMATION			
t-test of Solvent and Blank Controls		Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN	
GRP1 <SOLVENT CTRL> MEAN	= 2.5083	CALCULATED t VALUE	= -3.5631
GRP2 <BLANK CTRL> MEAN	= 2.9833	DEGREES OF FREEDOM	= 22
DIFFERENCE IN MEANS	= -0.4750		

TABLE t VALUE <0.05 (2),22>	= 2.074**	SIGNIFICANT DIFFERENCE at alpha=0.05	
TABLE t VALUE <0.01 (2),22>	= 2.819**	SIGNIFICANT DIFFERENCE at alpha=0.10	

APÊNDICE E (continuação)

Ensaio preliminares

Percolado SCC

PERCOLADO SOLO CONCHAL COM CINZA DE CARVÃO
File: PERCOLADO DE SCC Transform: NO TRANSFORMATION

Chi-square test for normality: actual and expected frequencies

INTERVAL	<-1.5	-1.5 to <-0.5	-0.5 to 0.5	>0.5 to 1.5	>1.5
EXPECTED	1.608	5.808	9.168	5.808	1.608
OBSERVED	0	10	7	6	1

Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic = 5.3825
Table Chi-Square value (alpha = 0.01) = 13.277

Data PASS normality test. Continue analysis.

PERCOLADO SOLO CONCHAL COM CINZA DE CARVÃO
File: PERCOLADO DE SCC Transform: NO TRANSFORMATION

Shapiro - Wilk's test for normality

D = 1.932
W = 0.941

Critical W (P = 0.05) (n = 24) = 0.916
Critical W (P = 0.01) (n = 24) = 0.884

Data PASS normality test at P=0.01 level. Continue analysis.

PERCOLADO SOLO CONCHAL COM CINZA DE CARVÃO
File: PERCOLADO DE SCC Transform: NO TRANSFORMATION

F-Test for equality of two variances

GROUP	IDENTIFICATION	VARIANCE	F
1	CONTROLE	0.041	
2	SCC	0.135	3.301

Critical F = 5.85 (P=0.01, 10, 10)

Since F <= Critical F, FAIL TO REJECT Ho: Equal Variances.

TOXSTAT

t-Test Results

PERCOLADO SOLO CONCHAL COM CINZA DE CARVÃO
File: PERCOLADO DE SCC Transform: NO TRANSFORMATION

t-test of Solvent and Blank Controls Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN

GRP1 (SOLVENT CTRL) MEAN =	2.5083	CALCULATED t VALUE =	-1.7911
GRP2 (BLANK CTRL) MEAN =	2.7250	DEGREES OF FREEDOM =	22
DIFFERENCE IN MEANS =	-0.2167		

TABLE t VALUE (0.05 (2),22) = 2.074 NO significant difference at alpha=0.05
TABLE t VALUE (0.01 (2),22) = 2.819 NO significant difference at alpha=0.01

APÊNDICE E (continuação)

Ensaio preliminares

Percolado SCC

PERCOLADO DA COLUNA DE CINZA DE CARUAO
File: PERCOLADO DA COLUNA DE CINZA DE CARUAO Transform: NO TRANSFORMATION

Chi-square test for normality: actual and expected frequencies

INTERVAL	<-1.5	-1.5 to <-0.5	-0.5 to 0.5	>0.5 to 1.5	>1.5
EXPECTED	1.608	5.808	9.168	5.808	1.608
OBSERVED	1	9	7	7	0

Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic = 4.3495
Table Chi-Square value (alpha = 0.01) = 13.277

Data PASS normality test. Continue analysis.

PERCOLADO DA COLUNA DE CINZA DE CARUAO:
File: PERCOLADO DA COLUNA DE CINZA DE CARUAO Transform: NO TRANSFORMATION

Shapiro - Wilk's test for normality

D = 1.146
W = 0.938

Critical W (P = 0.05) (n = 24) = 0.916
Critical W (P = 0.01) (n = 24) = 0.884

Data PASS normality test at P=0.01 level. Continue analysis.

PERCOLADO DA COLUNA DE CINZA DE CARUAO
File: PERCOLADO DA COLUNA DE CINZA DE CARUAO Transform: NO TRANSFORMATION

F-Test for equality of two variances

GROUP	IDENTIFICATION	UARIANCE	F
1	CONTROLE	0.041	
2	CINZA DE CARUAO	0.063	1.551

Critical F = 5.85 (P=0.01, 10, 10)

Since F <= Critical F, FAIL TO REJECT Ho: Equal Variances.

TOXSTAT		t-Test Results	
PERCOLADO DA COLUNA DE CINZA DE CARUAO		File: PERCOLADO DA COLUNA DE CINZA DE CARUAO Transform: NO TRANSFORMATION	
t-test of Solvent and Blank Controls		Ho: GRP1 MEAN = GRP2 MEAN	
GRP1 (SOLVENT CTRL) MEAN =	2.5083	CALCULATED t VALUE =	11.0015
GRP2 (BLANK CTRL) MEAN =	1.4833	DEGREES OF FREEDOM =	22
DIFFERENCE IN MEANS =	1.0250		
TABLE t VALUE (0.05 (2), 22) =	2.074	**	SIGNIFICANT DIFFERENCE at alpha=0.05
TABLE t VALUE (0.01 (2), 22) =	2.819	**	SIGNIFICANT DIFFERENCE at alpha=0.10

APÊNDICE E (continuação)

Ensaio definitivos

Percolado C 28

Teste percolado 28
File: Teste T Percolado C 28 radicula Transform: NO TRANSFORMATION

Chi-square test for normality: actual and expected frequencies

INTERVAL	<-1.5	-1.5 to <-0.5	-0.5 to 0.5	>0.5 to 1.5	>1.5
EXPECTED	0.536	1.936	3.056	1.936	0.536
OBSERVED	0	3	3	2	0

Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic = 1.6599
Table Chi-Square value (alpha = 0.01) = 13.277

Teste percolado 28
File: Teste T Percolado C 28 radicula Transform: NO TRANSFORMATION

Shapiro - Wilk's test for normality

D = 0.204
W = 0.968

Critical W (P = 0.05) (n = 8) = 0.818
Critical W (P = 0.01) (n = 8) = 0.749

Data PASS normality test at P=0.01 level. Continue analysis.

Teste percolado 28
File: Teste T Percolado C 28 radicula Transform: NO TRANSFORMATION

F-Test for equality of two variances

GROUP	IDENTIFICATION	VARIANCE	F
1	Controle	0.024	
2	100%	0.044	1.859

Critical F = 47.50 (P=0.01, 3, 3)

Since F <= Critical F, FAIL TO REJECT Ho: Equal Variances.

Teste percolado 28
File: Teste T Percolado C 28 radicula Transform: NO TRANSFORMATION

t-test of Solvent and Blank Controls Ho: GRP1 MEAN = GRP2 MEAN

GRP1 (SOLVENT CTRL) MEAN	=	2.3025	CALCULATED t VALUE	=	3.3524
GRP2 (BLANK CTRL) MEAN	=	1.8650	DEGREES OF FREEDOM	=	6
DIFFERENCE IN MEANS	=	0.4375			

TABLE t VALUE (0.05 (2), 6) = 2.447 ** SIGNIFICANT DIFFERENCE at alpha=0.05
TABLE t VALUE (0.01 (2), 6) = 3.707 NO significant difference at alpha=0.01

APÊNDICE E (continuação)

Ensaio definitivos

Percolado C 56

Teste percolado 56
File: Teste I Percolado C 56 Transform: NO TRANSFORMATION

Chi-square test for normality: actual and expected frequencies

INTERVAL	<-1.5	-1.5 to <-0.5	-0.5 to 0.5	>0.5 to 1.5	>1.5
EXPECTED	0.536	1.936	3.056	1.936	0.536
OBSERVED	0	3	2	3	0

Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic = 2.6064
Table Chi-Square value (alpha = 0.01) = 13.277

Data PASS normality test. Continue analysis.

Teste percolado 56
File: Teste I Percolado C 56 Transform: NO TRANSFORMATION

Shapiro - Wilk's test for normality

D = 0.062
W = 0.975

Critical W (P = 0.05) (n = 8) = 0.818
Critical W (P = 0.01) (n = 8) = 0.749

Data PASS normality test at P=0.01 level. Continue analysis.

Teste percolado 56
File: Teste I Percolado C 56 Transform: NO TRANSFORMATION

F-Test for equality of two variances

GROUP	IDENTIFICATION	VARIANCE	F
1	Controle	0.013	
2	100%	0.007	1.867

Critical F = 47.50 (P=0.01, 3, 3)

Since F <= Critical F, FAIL TO REJECT Ho: Equal Variances.

Teste percolado 56
File: Teste I Percolado C 56 Transform: NO TRANSFORMATION

t-test of Solvent and Blank Controls Ho: GRP1 MEAN = GRP2 MEAN

GRP1 (SOLVENT CTRL) MEAN =	2.1950	CALCULATED t VALUE =	17.2756
GRP2 (BLANK CTRL) MEAN =	0.9575	DEGREES OF FREEDOM =	6
DIFFERENCE IN MEANS =	1.2375		

TABLE t VALUE (0.05 (2), 6) = 2.447 ** SIGNIFICANT DIFFERENCE at alpha=0.05
TABLE t VALUE (0.01 (2), 6) = 3.707 ** SIGNIFICANT DIFFERENCE at alpha=0.10

APÊNDICE E (continuação)

Ensaio definitivos

Percolado C 84

Teste percolado 84
File: Teste T percolado C 84 Transform: NO TRANSFORMATION

Chi-square test for normality: actual and expected frequencies

INTERVAL	<-1.5	-1.5 to <-0.5	-0.5 to 0.5	>0.5 to 1.5	>1.5
EXPECTED	0.536	1.936	3.056	1.936	0.536
OBSERVED	0	2	4	2	0

Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic = 1.3678
Table Chi-Square value (alpha = 0.01) = 13.277

Data PASS normality test. Continue analysis.

Teste percolado 84
File: Teste T percolado C 84 Transform: NO TRANSFORMATION

Shapiro - Wilk's test for normality

D = 0.846
W = 0.913

Critical W (P = 0.05) (n = 8) = 0.818
Critical W (P = 0.01) (n = 8) = 0.749

Data PASS normality test at P=0.01 level. Continue analysis.

Teste percolado 84
File: Teste T percolado C 84 Transform: NO TRANSFORMATION

F-Test for equality of two variances

GROUP	IDENTIFICATION	VARIANCE	F
1	Controle	0.266	
2	100%	0.016	16.176

Critical F = 47.50 (P=0.01, 3, 3)

Since F <= Critical F, FAIL TO REJECT Ho: Equal Variances.

Teste percolado 84
File: Teste T percolado C 84 Transform: NO TRANSFORMATION

t-test of Solvent and Blank Controls Ho: GRP1 MEAN = GRP2 MEAN

GRP1 (SOLVENT CTRL) MEAN =	2.8375	CALCULATED t VALUE =	6.7213
GRP2 (BLANK CTRL) MEAN =	1.0525	DEGREES OF FREEDOM =	6
DIFFERENCE IN MEANS =	1.7850		

TABLE t VALUE (0.05 (2), 6) = 2.447 ** SIGNIFICANT DIFFERENCE at alpha=0.05
TABLE t VALUE (0.01 (2), 6) = 3.707 ** SIGNIFICANT DIFFERENCE at alpha=0.10

APÊNDICE F – Dados estatísticos para calcular os valores de CENO e CEO dos percolados 28, 56 e 84 da coluna de cinza de carvão nos ensaios definitivos com sementes de *L. sativa*

Percolado 28

```

Percolado 28
File: Percolado 28 dias crescimento da radícula Transform: NO TRANSFORMATI
ON
Chi-square test for normality: actual and expected frequencies
-----
INTERVAL <-1.5 -1.5 to <-0.5 -0.5 to 0.5 >0.5 to 1.5 >1.5
-----
EXPECTED 1.876 6.776 10.696 6.776 1.876
OBSERVED 0 9 12 7 0
-----
Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic = 4.6483
Table Chi-Square value (alpha = 0.01) = 13.277
Data PASS normality test. Continue analysis.
    
```

```

Percolado 28
File: Percolado 28 dias crescimento da radícula Transform: NO TRANSFORMATI
ON
Shapiro Wilks test for normality
-----
D = 0.576
W = 0.954
Critical W (P = 0.05) (n = 28) = 0.924
Critical W (P = 0.01) (n = 28) = 0.896
-----
Data PASS normality test at P=0.01 level. Continue analysis.
    
```

```

Percolado 28
File: Percolado 28 dias crescimento da radícula Transform: NO TRANSFORMATI
ON
Hartley test for homogeneity of variance
-----
Calculated H statistic (max Var/min Var) = 3.04
Closest, conservative, Table H statistic = 216.0 (alpha = 0.01)
Used for Table H ==> R (# groups) = 7, df (# reps-1) = 3
Actual values ==> R (# groups) = 7, df (# avg reps-1) = 3.00
-----
Data PASS homogeneity test. Continue analysis.
NOTE: This test requires equal replicate sizes. If they are unequal
but do not differ greatly, the Hartley test may still be used
as an approximate test (average df are used).
    
```


APÊNDICE F (continuação)

Percolado 28

```

Percolado . 28
File: Percolado 28 dias crescimento da radícula      Transform: NO TRANSFORMATI
ION
Bartlett's test for homogeneity of variance
-----
Calculated B statistic = 1.11
Table Chi-square value = 16.81 (alpha = 0.01)
Table Chi-square value = 12.59 (alpha = 0.05)
Average df used in calculation ==> df (avg n - 1) = 3.00
Used for Chi-square table value ==> df (#groups-1) = 6
-----
Data PASS homogeneity test at 0.01 level. Continue analysis.
NOTE: If groups have unequal replicate sizes the average replicate size is
used to calculate the B statistic (see above).
    
```

```

Percolado : 28
File: Percolado 28 dias crescimento da radícula      Transform: NO TRANSFORMATI
ION
ANOVA TABLE
-----
SOURCE          DF          SS          MS          F
-----
Between         6          2.169        0.361        13.188
Within (Error)  21         0.576        0.027
-----
Total          27         2.744
-----
Critical F value = 2.57 (0.05,6,21)
Since F > Critical F REJECT Ho:All groups equal
    
```

```

Percolado 28
File: Percolado 28 dias crescimento da radícula      Transform: NO TRANSFORMATI
ION
DUNNETT'S TEST - TABLE 1 OF 2
Ho:Control<Treatment
-----
GROUP  IDENTIFICATION  TRANSFORMED  MEAN CALCULATED IN  T STAT  SIG
      IDENTIFICATION  MEAN          ORIGINAL UNITS
-----
1      Controle        2.303        2.303
2      3.123%            2.020        2.020        2.413
3      6.25%             2.382        2.382       -0.683
4      12.5%              2.202        2.202        0.854
5      25%                1.665        1.665        5.446 *
6      50%                1.635        1.635        5.702 *
7      100%               1.865        1.865        3.737 *
-----
Dunnett table value = 2.46 (1 Tailed Value, P=0.05, df=20,6)
    
```

APÊNDICE F (continuação)

Percolado 28

```

Percolado 28
File: Percolado 28 dias crescimento da radícula          Transform: NO TRANSFORMATI
ION
DUNNETTS TEST - TABLE 2 OF 2                               Ho:Control<Treatment
-----
GROUP  IDENTIFICATION  NUM OF  Minimum Sig Diff  % of  DIFFERENCE
      REPS              <IN ORIG. UNITS>  CONTROL  FROM CONTROL
-----
1      Controle         4
2      3.123%          4      0.288      12.5      0.283
3      6.25%           4      0.288      12.5      -0.080
4      12.5%           4      0.288      12.5      0.100
5      25%             4      0.288      12.5      0.638
6      50%             4      0.288      12.5      0.668
7      100%            4      0.288      12.5      0.438
-----
    
```

Percolado 56

```

Percolado 56
File: Percolado 56 dias crescimento da radícula          Transform: NO TRANSFORMATI
ION
Chi-square test for normality: actual and expected frequencies
-----
INTERVAL  <-1.5  -1.5 to <-0.5  -0.5 to 0.5  >0.5 to 1.5  >1.5
-----
EXPECTED  1.876      6.776      10.696      6.776      1.876
OBSERVED  0           8          10          10          0
-----
Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic = 5.5524
Table Chi-Square value (alpha = 0.01) = 13.277
Data PASS normality test. Continue analysis.
    
```

```

Percolado 56
File: Percolado 56 dias crescimento da radícula          Transform: NO TRANSFORMATI
ION
Shapiro Wilks test for normality
-----
D = 1.491
W = 0.943
Critical W (P = 0.05) (n = 28) = 0.924
Critical W (P = 0.01) (n = 28) = 0.896
-----
Data PASS normality test at P=0.01 level. Continue analysis.
    
```

APÊNDICE F (continuação)

Percolado 56

```

Percolado      56
File: Percolado 56 dias crescimento da radricula      Transform: NO TRANSFORMATI
ION
Hartley test for homogeneity of variance
-----
Calculated H statistic (max Var/min Var) =   39.85
Closest, conservative, Table H statistic =  216.0 (alpha = 0.01)
Used for Table H ==>      R (# groups) =   7,      df (# reps-1) =   3
Actual values      ==>      R (# groups) =   7,      df (# avg reps-1) =  3.00
-----
Data PASS homogeneity test. Continue analysis.
NOTE: This test requires equal replicate sizes. If they are unequal
      but do not differ greatly, the Hartley test may still be used
      as an approximate test (average df are used).
    
```

```

Percolado      56
File: Percolado 56 dias crescimento da radricula      Transform: NO TRANSFORMATI
ION
Bartlett's test for homogeneity of variance
-----
Calculated B statistic =   14.03
Table Chi-square value =   16.81 (alpha = 0.01)
Table Chi-square value =   12.59 (alpha = 0.05)
Average df used in calculation ==>      df (avg n - 1) =   3.00
Used for Chi-square table value ==>      df (#groups-1) =   6
-----
Data PASS homogeneity test at 0.01 level. Continue analysis.
NOTE: If groups have unequal replicate sizes the average replicate size is
      used to calculate the B statistic (see above).
    
```

```

Percolado      56
File: Percolado 56 dias crescimento da radricula      Transform: NO TRANSFORMATI
ION
ANOVA TABLE
-----
SOURCE          DF          SS          MS          F
-----
Between          6          19.730         3.288         46.309
Within (Error)  21          1.491         0.071
Total           27          21.222
-----
Critical F value =   2.57 (0.05,6,21)
Since F > Critical F REJECT Ho:All groups equal
    
```

APÊNDICE F (continuação)

Percolado 56

Percolado 56
File: Percolado 56 dias crescimento da radícula Transform: NO TRANSFORMAT
ION

DUNNETTS TEST - TABLE 1 OF 2 Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	TRANSFORMED MEAN	MEAN CALCULATED IN ORIGINAL UNITS	T STAT	SIG
1	Controle	2.195	2.195		
2	3,123%	3.093	3.093	-4.763	
3	6,25%	3.065	3.065	-4.617	
4	12,5%	2.478	2.478	-1.499	
5	25%	1.295	1.295	4.776	*
6	50%	1.128	1.128	5.665	*
7	100%	0.958	0.958	6.568	*

Dunnett table value = 2.46 <1 Tailed Value, P=0.05, df=20,6>

Percolado 56
File: Percolado 56 dias crescimento da radícula Transform: NO TRANSFORMAT
ION

DUNNETTS TEST - TABLE 2 OF 2 Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	NUM OF REPS	Minimum Sig Diff <IN ORIG. UNITS>	% of CONTROL	DIFFERENCE FROM CONTROL
1	Controle	4			
2	3,123%	4	0.464	21.1	-0.897
3	6,25%	4	0.464	21.1	-0.870
4	12,5%	4	0.464	21.1	-0.282
5	25%	4	0.464	21.1	0.900
6	50%	4	0.464	21.1	1.068
7	100%	4	0.464	21.1	1.238

Percolado 84

Percolado 84
File: Percolado 84 dias crescimento da radícula Transform: NO TRANSFORMATIO
N

Chi-square test for normality: actual and expected frequencies

INTERVAL	<-1.5	-1.5 to <-0.5	-0.5 to 0.5	>0.5 to 1.5	>1.5
EXPECTED	1.876	6.776	10.696	6.776	1.876
OBSERVED	0	8	11	9	0

Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic = 4.7117
Table Chi-Square value (alpha = 0.01) = 13.277

Data PASS normality test. Continue analysis.

APÊNDICE F (continuação)

Percolado 84

```
Percolado      84
File: Percolado 84 dias Crescimento da radícula      Transform: NO TRANSFORMATIO
N
Shapiro Wilks test for normality
-----
D =      1.428
W =      0.955
Critical W <P = 0.05> (n = 28) = 0.924
Critical W <P = 0.01> (n = 28) = 0.896
-----
Data PASS normality test at P=0.01 level. Continue analysis.
```

```
Percolado      84
File: Percolado 84 dias Crescimento da radícula      Transform: NO TRANSFORMATIO
N
Hartley test for homogeneity of variance
-----
Calculated H statistic (max Var/min Var) = 18.07
Closest, conservative, Table H statistic = 216.0 <alpha = 0.01>
Used for Table H ==>      R (# groups) = 7,      df (# reps-1) = 3
Actual values      ==>      R (# groups) = 7,      df (# avg reps-1) = 3.00
-----
Data PASS homogeneity test. Continue analysis.
NOTE: This test requires equal replicate sizes. If they are unequal
but do not differ greatly, the Hartley test may still be used
as an approximate test (average df are used).
```

```
Percolado      84
File: Percolado 84 dias Crescimento da radícula      Transform: NO TRANSFORMATIO
N
Bartlett's test for homogeneity of variance
-----
Calculated B statistic = 9.87
Table Chi-square value = 16.81 <alpha = 0.01>
Table Chi-square value = 12.59 <alpha = 0.05>
Average df used in calculation ==>      df (avg n - 1) = 3.00
Used for Chi-square table value ==>      df (#groups-1) = 6
-----
Data PASS homogeneity test at 0.01 level. Continue analysis.
NOTE: If groups have unequal replicate sizes the average replicate size is
used to calculate the B statistic (see above).
```

APÊNDICE F (continuação)

Percolado 84

Percolado de 84 dias
File: Percolado 84 dias crescimento da radícula Transform: NO TRANSFORMATI
ON

ANOVA TABLE

SOURCE	DF	SS	MS	F
Between	6	18.161	3.027	44.506
Within (Error)	21	1.428	0.068	
Total	27	19.589		

Critical F value = 2.57 (<0.05,6,21)
Since F > Critical F REJECT Ho:All groups equal

Percolado 84
File: Percolado 84 dias crescimento da radícula Transform: NO TRANSFORMATI
ON

DUNNETTS TEST - TABLE 1 OF 2 Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	TRANSFORMED MEAN	MEAN CALCULATED IN ORIGINAL UNITS	T STAT	SIG
1	Controle	2.838	2.838		
2	3,123%	3.345	3.345	-2.752	
3	6,25%	3.002	3.002	-0.895	
4	12,5%	2.780	2.780	0.312	
5	25%	1.983	1.983	4.637	*
6	50%	1.410	1.410	7.741	*
7	100%	1.052	1.052	9.680	*

Dunnett table value = 2.46 (<1 Tailed Value, P=0.05, df=20,6)

Percolado 84
File: Percolado 84 dias crescimento da radícula Transform: NO TRANSFORMATI
ON

DUNNETTS TEST - TABLE 2 OF 2 Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	NUM OF REPS	Minimum Sig Diff (IN ORIG. UNITS)	% of CONTROL	DIFFERENCE FROM CONTROL
1	Controle	4			
2	3,123%	4	0.454	16.0	-0.507
3	6,25%	4	0.454	16.0	-0.165
4	12,5%	4	0.454	16.0	0.058
5	25%	4	0.454	16.0	0.855
6	50%	4	0.454	16.0	1.428
7	100%	4	0.454	16.0	1.785

APÊNDICE F (continuação)

Percolado 84

Percolado 84		File: Percolado 84 dias crescimento da radícula			Transform: NO TRANSFORMATI
ANOVA TABLE					
SOURCE	DF	SS	MS	F	
Between	6	18.161	3.027	44.506	
Within (Error)	21	1.428	0.068		
Total	27	19.589			

Critical F value = 2.57 (0.05,6,21)
Since F > Critical F REJECT Ho:All groups equal

APÊNDICE G – Dados dos ensaios definitivos com *D. similis* para os percolados da coluna de cinza de carvão

Análise de: Percolado 28

Controle negativo: Água de cultivo de *D. similis*

Data do início do ensaio: 06/03/2012 Hora: 10:10

Data do término do ensaio: 08/03/2012 Hora: 10:05

Resultados do teste de toxicidade aguda com <i>Daphnia similis</i>						
Concentrações (%)	N° de organismos imóveis por réplicas				N° acumulado de organismos mortos ou imóveis	Medidas finais
	R 1	R 2	R 3	R 4		
Controle	1	0	0	0	1	6.98
3,125	0	0	1	0	1	7.10
6,25	0	0	1	1	2	7.04
12,5	0	0	1	0	1	7.09
25	1	3	2	0	6	7.12
50	5	5	5	5	20	6.99
100	5	5	5	5	20	7.00

Análise de: Percolado 56

Controle negativo: Água de cultivo de *D. similis*

Data do início do ensaio: 28/02/2012 Hora: 9:05

Data do término do ensaio: 01/03/2012 Hora: 9:20

Resultados do teste de toxicidade aguda com <i>Daphnia similis</i>						
Concentrações (%)	N° de organismos imóveis por réplicas				N° acumulado de organismos mortos ou imóveis	Medidas finais
	R 1	R 2	R 3	R 4		
Controle	0	0	1	0	1	6.88
3,125	1	1	0	0	2	7.10
6,25	0	1	0	0	1	6.98
12,5	1	1	0	0	2	7.20
25	2	0	1	1	4	7.00
50	4	3	4	4	15	7.19
100	5	5	5	5	20	7.30

APÊNDICE G (continuação)

Análise de: Percolado 84

Controle negativo: Água de cultivo de *D. similis*

Data do início do ensaio: 13/03/2012 Hora: 9:30

Data do término do ensaio: 15/03/2012 Hora: 9:45

<i>Resultados do teste de toxicidade aguda com <i>Daphnia similis</i></i>						
<i>Concentrações (%)</i>	<i>N° de organismos imóveis por réplicas</i>				<i>N° acumulado de organismos mortos ou imóveis</i>	<i>Medidas finais</i>
	<i>R 1</i>	<i>R 2</i>	<i>R 3</i>	<i>R 4</i>		
<i>Controle</i>	0	0	1	0	1	7.48
<i>3,125</i>	1	1	0	0	2	7.10
<i>6,25</i>	0	1	0	0	1	6.98
<i>12,5</i>	1	1	0	0	2	7.20
<i>25</i>	2	0	1	1	4	7.00
<i>50</i>	4	3	4	4	15	7.19
<i>100</i>	5	5	5	5	20	7.04

Análise de: Percolado 112

Controle negativo: Água de cultivo de *D. similis*

Data do início do ensaio: 03/04/2012 Hora: 09:10

Data do término do ensaio: 05/04/2012 Hora: 09:50

<i>Resultados do teste de toxicidade aguda com <i>Daphnia similis</i></i>						
<i>Concentrações (%)</i>	<i>N° de organismos imóveis por réplicas</i>				<i>N° acumulado de organismos mortos ou imóveis</i>	<i>Medidas finais</i>
	<i>R 1</i>	<i>R 2</i>	<i>R 3</i>	<i>R 4</i>		
<i>Controle</i>	0	0	0	1	1	7.47
<i>3,125</i>	1	0	0	0	1	7.10
<i>6,25</i>	0	0	0	0	0	7.10
<i>12,5</i>	0	0	0	0	0	7.06
<i>25</i>	0	0	0	0	0	7.00
<i>50</i>	0	0	0	0	0	7.18
<i>100</i>	2	5	2	4	13	6.78

APÊNDICE G (continuação)

Análise de: Percolado 168

Controle negativo: Água de cultivo de *D. similis*

Data do início do ensaio: 25/04/2012 Hora: 09:35

Data do término do ensaio: 27/04/2012 Hora: 09:00

<i>Resultados do teste de toxicidade aguda com <i>Daphnia similis</i></i>						
<i>Concentrações (%)</i>	<i>Nº de organismos imóveis por réplicas</i>				<i>Nº acumulado de organismos mortos ou imóveis</i>	<i>Medidas finais</i>
	<i>R 1</i>	<i>R 2</i>	<i>R 3</i>	<i>R 4</i>		
<i>Controle</i>	0	0	0	1	1	7.50
<i>3,125</i>	1	0	0	0	0	7.34
<i>6,25</i>	1	0	0	1	2	7.20
<i>12,5</i>	0	0	1	0	1	7.12
<i>25</i>	1	2	0	0	3	7.39
<i>50</i>	0	3	1	3	7	7.04
<i>100</i>	3	2	3	3	11	7.00

APÊNDICE H – Dados estatísticos para calcular os valores de CE50_(48h) dos percolados 28, 56, 84, 112 e 168 da coluna de cinza de carvão nos ensaios definitivos com *D. similis*

Percolado 28

```

ENTER THE NUMBER OF MORTALITIES AT EACH CONCENTRATION:
1
2
1
6
20
20

WOULD YOU LIKE THE AUTOMATIC TRIM CALCULATION<Y/N>? Y

DATE: 06 03 12          TEST NUMBER: 1          DURATION: 48 HOURS
CHEMICAL: PERCOLADO 28 DA COLUNA DE CINZA DE CARVAO    SPECIES: DAPHNIA SIMILIS

RAW DATA:
CONCENTRATION<%>          3.12   6.25  12.50  25.00  50.00 100.00
NUMBER EXPOSED:           20    20   20    20    20    20
MORTALITIES:              1     2    1     6    20    20
SPEARMAN-KARBER TRIM:          5.00%

SPEARMAN-KARBER ESTIMATES:  EC50:          27.56
                          95% LOWER CONFIDENCE:  22.42
                          95% UPPER CONFIDENCE:  33.89

NOTE: MORTALITY PROPORTIONS WERE NOT MONOTONICALLY INCREASING.
      ADJUSTMENTS WERE MADE PRIOR TO SPEARMAN-KARBER ESTIMATION.
    
```

Percolado 56

```

ENTER THE NUMBER OF MORTALITIES AT EACH CONCENTRATION:
2
1
2
4
15
20

WOULD YOU LIKE THE AUTOMATIC TRIM CALCULATION<Y/N>? Y

DATE: 28 02 12          TEST NUMBER: 1          DURATION: 48 HOURS
CHEMICAL: PERCOLADO 56 DA COLUNA DE CINZA DE CARVAO    SPECIES: DAPHNIA SIMILIS

RAW DATA:
CONCENTRATION<%>          3.12   6.25  12.50  25.00  50.00 100.00
NUMBER EXPOSED:           20    20   20    20    20    20
MORTALITIES:              2     1    2     4    15    20
SPEARMAN-KARBER TRIM:          7.50%

SPEARMAN-KARBER ESTIMATES:  EC50:          35.32
                          95% LOWER CONFIDENCE:  27.74
                          95% UPPER CONFIDENCE:  44.96

NOTE: MORTALITY PROPORTIONS WERE NOT MONOTONICALLY INCREASING.
      ADJUSTMENTS WERE MADE PRIOR TO SPEARMAN-KARBER ESTIMATION.
    
```

APÊNDICE H (continuação)

Percolado 84

```
ENTER THE NUMBER OF MORTALITIES AT EACH CONCENTRATION:
4
3
3
7
7
15

WOULD YOU LIKE THE AUTOMATIC TRIM CALCULATION<Y/N>? Y

DATE: 13 03 12          TEST NUMBER: 1          DURATION: 48 HOURS
CHEMICAL: PERCOLADO 84 DA COLUNA DE CINZA DE CARUAO    SPECIES: DAPHNIA SIMILIS

RAW DATA:
CONCENTRATION(<math>\times</math>)          3.12    6.25    12.50    25.00    50.00    100.00
NUMBER EXPOSED:                20      20      20      20      20      20
MORTALITIES:                    4       3       3       7       7       15
SPEARMAN-KARBER TRIM:          25.00%

SPEARMAN-KARBER ESTIMATES:      EC50:          55.30
                                95% LOWER CONFIDENCE: 36.31
                                95% UPPER CONFIDENCE: 84.23

NOTE: MORTALITY PROPORTIONS WERE NOT MONOTONICALLY INCREASING.
      ADJUSTMENTS WERE MADE PRIOR TO SPEARMAN-KARBER ESTIMATION.
```

Percolado 112

```
ENTER THE NUMBER OF MORTALITIES AT EACH CONCENTRATION:
1
0
0
0
0
13

WOULD YOU LIKE THE AUTOMATIC TRIM CALCULATION<Y/N>? Y

DATE: 03 04 12          TEST NUMBER: 1          DURATION: 48 HOURS
CHEMICAL: PERCOLADO 112 DA COLUNA DE CINZA DE CARUAO    SPECIES: DAPHNIA SIMILIS

RAW DATA:
CONCENTRATION(<math>\times</math>)          3.12    6.25    12.50    25.00    50.00    100.00
NUMBER EXPOSED:                20      20      20      20      20      20
MORTALITIES:                    1       0       0       0       0       13
SPEARMAN-KARBER TRIM:          35.00%

SPEARMAN-KARBER ESTIMATES:      EC50:          85.01
                                95% LOWER CONFIDENCE: 71.20
                                95% UPPER CONFIDENCE: 101.49

NOTE: MORTALITY PROPORTIONS WERE NOT MONOTONICALLY INCREASING.
      ADJUSTMENTS WERE MADE PRIOR TO SPEARMAN-KARBER ESTIMATION.
```

APÊNDICE H (continuação)

Percolado 168

```
ENTER THE NUMBER OF MORTALITIES AT EACH CONCENTRATION:
0
2
1
3
7
11
WOULD YOU LIKE THE AUTOMATIC TRIM CALCULATION<Y/N>? Y

DATE: 25 04 12          TEST NUMBER: 1          DURATION: 48 HOURS
CHEMICAL: PERCOLADO 168 DA COLUNA DE CINZA DE CARUAO  SPECIES: DAPHNIA SIMILIS

RAW DATA:
CONCENTRATION<%>          3.12   6.25   12.50  25.00  50.00 100.00
NUMBER EXPOSED:           20    20    20    20    20    20
MORTALITIES:              0     2     1     3     7    11
SPEARMAN-KARBER TRIM:           45.00%

SPEARMAN-KARBER ESTIMATES:  EC50:           84.09
                          95% LOWER CONFIDENCE: 45.82
                          95% UPPER CONFIDENCE: 154.32

NOTE: MORTALITY PROPORTIONS WERE NOT MONOTONICALLY INCREASING.
      ADJUSTMENTS WERE MADE PRIOR TO SPEARMAN-KARBER ESTIMATION.
```

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, W.J.; ROWLAND, C.D. Aquatic Toxicology Test Methods. In HOFFMAN, D.J.; RATTNER, B.A.; BURTON Jr, G.A.; CAIRNS Jr, J. (Editores) **Handbook of Ecotoxicology**, Washington, D.C.: Lewis Publishers. 2.ed. p. 32 – 58, 2002.

ADRIANO, D. C.; PAGE, A. L.; ELSEEWI, A. A.; CHANG, A. C.; STRAUGHAN, I. Utilization and Disposal of Fly Ash and Other Coal Residues in Terrestrial Ecosystems. **J. Environ. Qual.**, v 9, n.9, p 333-344, 1980.

AGÊNCIA INTERNACIONAL DE ENERGIA - **AIE**. “Coal’s share of global energy mix to continue rising, with coal closing in on oil as world’s top energy source by 2017.” 2012. Disponível em: <<http://www.iea.org>>. Acesso em: 15 jan. 2013.

AGÊNCIA INTERNACIONAL DE ENERGIA - **AIE**. International Energy Outlook. Center for Strategic and International Studies, U.S. Energy Information Administration, Washington, DC: Independent Statistics & Analysis. 2011. Disponível em: <<http://www.iea.org>>. Acesso em: 15 jan. 2013.

AGÊNCIA NACIONAL DE ENERGIA ELÉTRICA. **ANEEL**. 2011. Disponível em: <<http://www.aneel.gov.br>>. Acesso em: 17 out. 2012.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS – **Standard practice for conducting early seedling growth tests**, ASTM ,1994.(E1598-94).

ARAGÃO, M.A.; ARAÚJO, R.P.A. Métodos de ensaios de toxicidade com organismos aquáticos. In ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. (Editores). **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações**, São Carlos, São Paulo: Rima, 2008. p. 117 – 147.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DO CARVÃO MINERAL - **ABMC**. 2011. Disponível em: <<http://www.carvaomineral.com.br>> . Acesso em: 21 ago. 2012.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Rochas e solos**. Rio de Janeiro: ABNT, 1995. (NBR 6502).

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, **Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com *Daphnia ssp* (*Cladocera, Crustacea*)**. Rio de Janeiro: ABNT, 2004 (NBR 12713).

AZZOLINI, M. **Restauração ecológica de áreas impactadas por cinzas de carvão mineral: contribuição da mamona (*Ricinus communis L.*) e resposta da espécie a metais pesados**. Tese (doutorado). Instituto de Biociências programa de Pós-graduação em Botânica, Porto Alegre, 2008.

BERTOLETTI, E.; ZAGATTO, P.A. Aplicação dos Ensaio Ecotoxicológicos e Legislação Pertinente. In ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. (Editores). **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações**, São Carlos, São Paulo: Rima, 2008. p. 347 - 379.

BLAISE, C. Introduction to ecotoxicological concepts. Assessment, Proceedings of Biological Testing and Harzard, **Environmental Canada**, p. 11 – 47, 1984.

BRADY, N. C. **Natureza e propriedades dos solos**. 7.ed. Rio de Janeiro: Freitas Bastos, 1989.

BOWERS, N.; PRATT, J.R.; BEESON D.; LEWIS M. Comparative Evaluation of Soil Toxicity using Lettuce Seeds and Soil Ciliates. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 16, n.2, p. 207-213, 1997.

BURTON Jr., G.A.; DENTON, D.L.; HO, K.; IRELAND, D.S. Sediment Toxicity Testing: Issues and Methods. In HOFFMAN, D.J.; RATTNER, B.A.; BURTON Jr, G.A.; CAIRNS Jr, J. (Editores) **Handbook of Ecotoxicology**, Washington, D.C.: Lewis Publishers. 2.ed. p.124- 164, 2002.

CELERE, M.S.; OLIVEIRA, A.S.; TREVIATO, T.M.B.; MUÑOZ, S.I.S. Metais presentes no chorume coletado no aterro sanitário de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil, e sua relevância para saúde pública. **C. Saúde Pública**, v. 23, n. 4, p. 939-947, 2007.

CERUTTI, P.F.; FLORES, F.E.V. Bioindicação da contaminação atmosférica decorrente do uso do carvão In: Canto, M.B. **Carvão e meio ambiente**, Porto Alegre, Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p. 461 – 469, 2000.

CHANG, A.C.; GRANTO, T.C.; PAGE, A.L. A methodology for establishing phytotoxicity criteria for chromium, copper, nickel and zinc in agricultural land application of municipal sewage sludges. **Environ. Qual.**, v. 21, n. 4, p. 521-536, 1992.

CHAPMAN, E.E.V.; DAVE, G.; MURIMBOH. J.D. Ecotoxicological risk assessment of undisturbed metal contaminated soil at two remote lighthouse sites. **Ecotox. Environ. Safe.**, v. 73, n. 5, p. 961–969, 2010.

CIRINO, F.S. **Investigação dos níveis de mercúrio total em amostras de solos, sedimentos e águas da região estuarina de Santos e São Vicente**, SP. Dissertação (Mestrado) Universidade Católica de Santos, Santos, 2009.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL - CETESB. **Decisão de Diretoria Nº 195- 2005-E**. São Paulo: CETESB, 2005.

CONAMA – **Conselho Nacional do Meio Ambiente Resolução nº357**, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências.

CONAMA – **Conselho Nacional do Meio Ambiente Resolução nº396**, de 7 de abril de 2008. Dispõe sobre a classificação e diretrizes ambientais para o enquadramento das águas subterrâneas e dá outras providências.

CONSTITUIÇÃO FEDERAL, **Constituição Federativa do Brasil**. Brasília, DF: Senado, 1988.

COOK, S.V.; CHU, A.; GOODMAN, R.H. Leachability and toxicity of hydrocarbons, metals and salt contamination from flare pit soil. **Water Air Soil Poll.**, v. 133, n.4, p. 297–314, 2002.

COSTA, C.R.; OLIVI, P.A.; BOTTA, C.M.R.; ESPÍNDOLA, E.L.G. Toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. Revisão. **Quím. Nova**, v. 31, n.7, p. 1820-1830, 2008.

DOMINGUES, D.F.; BERTOLETTI, E. Seleção, Manutenção e Cultivo de Organismos Aquáticos. In: Zagatto, P.A.; Bertolotti, E. (Editores) **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações**, São Carlos, São Paulo: Rima, 2008.

DEPOI, F.S.; POZEBON, D.; KALKREUTH, W.D. Chemical characterization of feed coals and combustion by products from Brazilian power plants. **Int. J. Coal Geol.** v. 76, n.3, p. 227 – 236, 2008.

EI MOGAZI, D.; LISK, D.J.; WEINSTEIN, L.H. A review of physical, chemical, and biological properties of fly ash and effects on agricultural ecosystems. **Sci. Total Environ.**, v. 74, n.1, p 1-37, 1988.

EMPRESA BRASILEIRA DE AGROPECUÁRIA – EMBRAPA - **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. Rio de Janeiro, 2º ed.: Centro Nacional de Pesquisas de Solos, 2006.

EMPRESA BRASILEIRA DE AGROPECUÁRIA – EMBRAPA – **O silício combate estresses nutricionais**. Mato Grosso do Sul, Agropecuária Oeste, 2013.

ENVIRONMENTAL CANADA – **Guidance document on control of toxicity test precision using reference toxicants**. Report EPS 1/RM/12. p.85, 1990.

ENVIRONMENTAL CANADA – **Biological Test Method: Test for Measuring Emergence and Growth of Terrestrial Plants Exposed to Contaminants in Soil**. Environmental protection series, EPS 1/ RM/45, 2005.

FAIRBROTHER, A.; WENSTE, R.; SAPPINGTON, K.; WOOD, W. Framework for Metals Risk Assessment. **Ecotoxicol. Environ. Safe.**, v. 68, n.2, p.145–227, 2007a.

FAIRBROTHER, A.; De VITO, S.; MOUNT, D.; SAPPINGTON, K. United States **Development of a Framework for Metals Risk Assessment**. Environmental Protection Agency. US EPA (120/R-07/001). 2007b. Disponível em: <<http://www.epa.gov/osa>>. Acesso em: 12 jan. 2013.

FAQUIN, V. **Nutrição mineral de plantas**. Lavras, M.G.: UFLA/FAEPE, 1997.

FERREIRA, A.L.N. **Exposição de Crômio em alface: acumulação e efeitos na fisiologia e genotoxicidade**. Dissertação (Mestrado). Departamento de Biologia Universidade de Aveiro, 2007.

FLUES, M.; SATO, I. M.; COTRIM, M. B.; FIGUEIREDO FILHO, P. M.; CAMARGO, I. M. C. Avaliação da influência da operação da termoelétrica a carvão na concentração dos metais e As no solo de Figueira, PR-Brasil. **Quím. Nova**. v.31, n.1, p.25-30, 2008.

FUENTES, A., LORÉNS, M.; SÁEZ, J.; AGUILAR, M.I.; PÉREZ-MARÍN, A.B.; ORTUÑO, J.F.; MESEGUER, V.F. Ecotoxicity, phytotoxicity and extractability of heavy metals from different stabilised sewage sludges. **Environ Pollut**. v.143, n. 2, p. 355 – 360, 2006.

FURLANI, A.M.C. Nutrição mineral. In Kerbauy, G.B. (Editor) **Fisiologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara, 2004. p. 40-75.

GAIVIZZO, L.H.B.; VIDOR, C.; TEDESCO, M.J.; MEURER, E. Pollutant potential of coal rejects – chemical characterization of the leached water. **Cienc Rural**, v. 32, n. 5, p. 771 – 780, 2002.

GUERRA, R.C. **Estudo do lodo gerado em reator biológico, pelo tratamento da água de produção do petróleo, no Terminal Marítimo Almirante Barroso, município de São Sebastião, SP. Visando sua disposição final**. Tese (doutorado). Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2009

GULLEY, D.D.; BOELTER, A.M.; BERGMAN, H.L. TOXSTAT 3.5. **Computer Program**, 1995.

HAMILTON, M.A.; RUSSO, R.C.; THURSTON, R.V. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in bioassays. ***Environ. Sci Technol.***, v. 12, n. 4, p.417, 1999.

HAMON, R.; McLAUGHLIN, M.; LOMBI, E. (Editores). ***Natural attenuation of trace element availability in soils***. Boca Raton: CRC Press, 2007.

HOFFMAN, D.J.; RATTNER, B.A.; BURTON Jr., G.A.; CAIRNS Jr., J. Introduction. In HOFFMAN, D.J.; RATTNER, B.A.; BURTON Jr, G.A.; CAIRNS Jr, J. (Editores) ***Handbook of Ecotoxicology***, Washington, D.C.: Lewis Publishers. 2.ed.p. 15 – 32, 2002.

IZIDORO, J.C. **Estudos sobre a remoção de íons metálicos em água usando zeólitas sintetizadas a partir de cinzas de carvão**. Dissertação (Mestrado). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2008.

LAMEIRA, V. **Estudo dos efeitos letais e subletais (reprodução e teratogênese) do fármaco triclosan para *Daphnia similis*, *Ceriodaphnia dubia*, *Ceriodaphnia silvestrii* (Cladóceras, Crustacea)**. Dissertação (Mestrado). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2008.

LANGE, C.N. **Contaminação do solo e mobilidade de As, Cd, Mo, Pb e Zn em colunas de solo franco arenoso com cinza de carvão**. Dissertação (Mestrado). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2012.

LARSON, R.; FARBER, B. ***Estatística aplicada***. São Paulo, Pearson Education do Brasil, 4ª edição, 2011.

LEFFA, D.D. **Avaliação do potencial genotóxico do rejeito de carvão mineral através do molusco *Helix aspersa* (Müller 1774)**. Bacharel (Ciências Biológicas) Universidade do Extremo Sul Catarinense, Santa Catarina, 2008.

LEPSCH, I.F. ***Formação e conservação dos solos***. São Paulo: Oficina de Textos, 2002.

LU, S.G.; CHEN, Y.Y.; SHAN, H.D.; BAI, S.Q. Mineralogy and heavy metal leachability of magnetic fractions separated from some Chinese coal fly ashes. ***J. Hazard. Mater.***, v.169, p. 246–255, 2009.

MARTENS, D.C.; BEHAM, B.R. Growth of plants in fly ash amended soils. *Inter. Ash Util. Symp*, St. Louis, MO, v. 26, p. 657- 64, 1976.

MARTINS, R.S.L. *Avaliação da toxicidade de águas de chuva a organismos aquáticos*. Dissertação (Mestrado). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2009.

MAZOYER, M.; ROUDART, L. *História da agricultura no mundo*. São Paulo : UNESP, 2010.

MCBRIDE, M.B. *Environmental Chemistry of Soils*. New York: Oxford University Press, 1994.

MEZA, J.C.S.; SALAZAR, V.F.P.; SILVA, T.B.P.; GARCÍA, V.G.G.; GONZÁLEZ, C.J.A.; GARCÍA, P.G. Toxicity assessment of a complex industrial wastewater using aquatic and terrestrial bioassays *Daphnia pulex* and *Lactuca sativa*. *J. Environ. Sci. Health Part A*, v. 42, n. 10, p. 1425–1431, 2007.

MINISTÉRIOS DAS MINAS E ENERGIA – MME - *Martiz Energética Nacional 2030*, Brasília, 2007.

MOZETO, A.A.; ZAGATTO, P.A. Introdução de agentes químicos no ambiente. In: ZAGATTO P.A.; BERTOLETTI E. *Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações*, São Carlos, São Paulo: Rima, 2008. p. 15-36.

NASCIMENTO, I.A.; PEREIRA, S.A.; LEITE, M.B.N.L. Biomarcadores como instrumentos preventivos de poluição. In: Zagatto, P.A.; Bertolletti, E. *Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações*, São Carlos, São Paulo: Rima, 2008. p. 413 – 429.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT – OECD - *Terrestrial Plant Test: 208: Seedling Emergence and Seedling Growth Test*. Guideline for the Testing of Chemicals Proposal for Updating Guideline 208, 2003.

PLAA, G.L. Present status: toxic substances in the environment. *Can. J. Physiol. Pharm.*, v.60, p.1010-1016, 1982.

POSTHUMA, L.; SUTER, G.W. TRAAS, T.P. **Species Sensitivity Distributions in Ecotoxicology**. Boca Raton, Florida: CRC Press, 2002.

PRINTES, L.B.; BOHRER, M.B.C.; PORTELA, C.M.S.; GÜNTZEL, C.E. Biomonitoramento da área sob influência da exploração carbonífera através de testes de toxicidade com cladocera (Crustacea; Branchiopoda). In: Canto, M.B. (Editor) **Carvão e o meio ambiente**, Porto Alegre, Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2000.

PROCHNOW, T.R.; PORTO. M.L. Avaliação de uma área de rejeitos da mineração de carvão com vistas a bioindicadores vegetais para metais pesados. In: Canto, M.B. **Carvão e o meio ambiente**,. Porto Alegre, Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p. 673 – 695, 2000.

RODGHER, S.; ESPÍNDOLA, E.L.G.; LOMBARDI, A.T. Suitability of *Daphnia similis* as an alternative organism in ecotoxicological tests: implications for metal toxicity. **Ecotoxicol.**, v. 19, n. 6, p. 1027 – 1033, 2010.

ROHDE, G. M.; RODRIGUEZ, M.T.R. Diagnóstico ambiental das cinzas de carvão. In: Canto, M.B. **Carvão e meio ambiente**, Porto Alegre, Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p. 461 – 469, 2000.

ROHDE, G.M.; ZWONOK, O.; CHIES, F.; SILVA, N.I.W.L. **Cinzas de Carvão Fóssil no Brasil – Aspectos técnicos e ambientais**. Porto Alegre: CIENTEC, 2006.

ROONEY, C.P.; ZHAO, F-J.; MCGRATH, S.P. Phytotoxicity of nickel in a range of European soils: Influence of soil properties, Ni solubility and speciation. **Environ. Poll.**, v. 145, n. 2, p. 596 – 605, 2007.

SECO, J.I.; FERNANDEZ-PEREIRA,C.; VALE, J. A study of the leachate toxicity of metal-containing solid wastes using *Daphnia magna*. **Ecotoxicol. Environ. Safe.**, v. 56, n. 3, p. 339–350, 2003.

SILVA, J.C. **Mobilidade de As, Cd, Mo, Pb e Zn em colunas de latossolo argiloso com cinza de carvão e contaminação do solo**. Dissertação (Mestrado). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2013.

SILVA, N.I.W.; CARLAGE, L.M.; CHIES, F.; MALLMANN, J.E.; ZWONOK, O. Caracterização de cinzas volantes para aproveitamento cerâmico. **Cerâmica**, v. 45, n. 296, p. 184 – 187, 1999.

SCHNEIDER, P.; KÄMPF, N.; GIASSON, E. Solos. In: Canto, M.B. **Carvão e meio ambiente**, Porto Alegre, Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p. 461 – 469, 2000.

SOBRERO, M.C.; RONCO, A. Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L). In: Morales, G.C. **Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas: Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones**, IMTA, p. 63 -72., 2004.

SPOSITO, G. **The Chemistry of soils**. New York: Oxford University Press, 1989.

SUKANDAR, T.; PADMI, M.; TANAKA, E.; AOYAMA, I. Chemical stabilization of medical waste fly ash using chelating agent and phosphates: Heavy metals and ecotoxicity evaluation. **Waste Manage.**, v. 29, n. 7, p. 2065 – 2070, 2009.

UNITED STATES ENVIRONMENT CANADA. **Guidance document on control of toxicity test precision using reference toxicants**, p.85, 1990.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY - US EPA - **Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms**. Environmental Monitoring Systems Laboratory, Cincinnati - Ohio, 1993.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY - US EPA - **Seed Germination/ Root Elongation Toxicity Tests.” Ecological Effects Tests Guidelines**, 1996.

VALAVANIDIS, A.; VLACHOGIANNI, T. Metal Pollution in Ecosystems Ecotoxicology Studies and Risk Assessment in the Marine Environment. **Sci. Adv. Environ. Toxicol. and Ecotoxicol. Issues**. v.1, p. 57-84, 2010.

WANG, W. Root elongation method for toxicity of organic and inorganic pollutants. **Environ. Toxicol. Chem.**, v.6, n. 5, p. 409-414, 1987.

WARD, N.I. Trace Elements. In Fifield F.W.; Haines, P.J. (Editor) ***Environmental Analytical Chemistry***, London, Blackwell Science, 1995. p. 360-392.

WATER QUALITY COMMITTEE. ***Overview: metal toxicity***. 2010.

WONG, M. H, E BRADSHAW, A. D.. A Comparison of the toxicity of heavy metals, using root elongation of *Rye grass, Lolium perenne*. ***New Phytology***, v. 91, n. 2, p. 255-261, 1982.

WORLD ENERGY COUNCIL. ***Survey of Energy Resources***. London: Regency House, 2007.

WU, S.G.; HUANG, L.; HEAD, J.; CHEN, D-R.; KOMG, I.C.; TANG, Y.J. Phytotoxicity of Metal Oxide Nanoparticles is Related to Both Dissolved Metals Ions and Adsorption of Particles on Seed Surfaces. ***J. Petr. Environ. Biotech.***, v. 3, n.4, p. 2157-7463, 2012.

YU, M-H. ***Environmental Toxicology: Biological and Health Effects of Pollutans***. Boca Raton, Florida: CRC Press, 2004.

ZAGATTO, P.A. Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações In: ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. (Editores) ***Ecotoxicologia***. São Carlos, São Paulo: Rima, 2008. p. 3-15.