

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

RAFAEL ANTONIO SANTOS DA SILVA

PADRONIZAÇÃO DE BIOENSAIOS COM *LACTUCA SATIVA* L. E SUA  
APLICAÇÃO NA AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DE EFLUENTES CONTENDO  
AZOCORANTES TRATADOS POR FOTO-FENTON

MACEIÓ, AL  
2021

RAFAEL ANTONIO SANTOS DA SILVA

PADRONIZAÇÃO DE BIOENSAIOS COM *LACTUCA SATIVA* L. E SUA  
APLICAÇÃO NA AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DE EFLUENTES CONTENDO  
AZOCORANTES TRATADOS POR FOTO-FENTON

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência.

Área de Concentração: Desenvolvimento Tecnológico e Extensão Inovadora em Áreas Estratégicas de Química e Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Josealdo Tonholo  
Coorientadora: Dra. Cenira Monteiro de Carvalho

MACEIÓ, AL  
2021

**Catálogo na Fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

S586p Silva, Rafael Antonio Santos da.  
Padronização de bioensaios com *Lactuca sativa L.* e sua aplicação na avaliação toxicológica de efluentes contendo azocorantes tratados por foto-fenton / Rafael Antonio Santos da Silva – 2021.  
106 f. : il color.

Orientador: Josealdo Tonholo.

Coorientadora: Cenira Monteiro de Carvalho.

Dissertação (Mestrado em ciências) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia. Maceió, 2021.

Bibliografia: f. 95-102.

Anexo: f. 104-106.

1. Toxicologia Ambiental - Testes. 2. Foto-fenton. 3. Bioensaios. 4. Alface. I. Título.

CDU: 631.427.4:582.998.4



Ata da sessão referente à defesa de dissertação intitulada: Padronização de bioensaios com *Lactuca sativa* L. e sua aplicação na avaliação toxicológica de efluentes contendo azocorantes tratados por Foto-Fenton, para fins de obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIAS, área de concentração: Desenvolvimento Tecnológico e Extensão Inovadora em Áreas Estratégicas de Química e Biotecnologia e linha de pesquisa: Química Tecnológica, Biotecnologia e Empreendedorismo, pelo discente RAFAEL ANTONIO SANTOS DA SILVA sob orientação do Prof. Dr. Josealdo Tonholo e sob a coorientação da Profa. Dra. Cenira Monteiro de Carvalho.

No trigésimo dia do mês de agosto do ano de 2021, às 10:45h, por meio de videoconferência realizada através da ferramenta Google Meet, reuniu-se a Banca Examinadora em epígrafe, aprovada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação. Tendo o orientador declarado aberta a sessão, mediante o prévio exame do referido trabalho por parte de cada membro da Banca, o discente procedeu a apresentação de sua dissertação e foi submetido à arguição on-line pela Banca Examinadora que, em seguida, deliberou sobre o seguinte resultado:

(X) APROVADO.

( ) APROVADO CONDICIONALMENTE, mediante atendimento das alterações sugeridas pela Banca Examinadora, constantes na folha de correções que segue em anexo.

( ) REPROVADO, conforme parecer circunstanciado, registrado em documento anexo, elaborado pela Banca Examinadora.

Nada mais havendo a tratar, a orientadora declarou encerrada a sessão de Defesa, sendo a presente Ata lavrada e assinada pelos senhores membros da Banca Examinadora e pelo discente, atestando ciência do que nela consta.

**Dr<sup>a</sup>. CENIRA MONTEIRO DE CARVALHO, UFAL**

Examinadora Externa ao Programa

**Dr. WAGNER ROBERTO DE OLIVEIRA PIMENTEL, UFAL**

Examinador Externo ao Programa

**Dr<sup>a</sup>. CARMEM LUCIA DE PAIVA E SILVA ZANTA, UFAL**

Examinadora Interna



*Universidade Federal de Alagoas*  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA**

**Dr<sup>a</sup>. DANIELA SANTOS ANUNCIÇÃO, UFAL**

Examinadora Interna

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Josealdo Tonholo', is centered below the name.

**Dr. JOSEALDO TONHOLO, UFAL**

Presidente

*Rafael Brito Santos da Silva*  
**RAFAEL ANTONIO SANTOS DA SILVA**

Mestrando



FOLHA DE CORREÇÕES

ATA Nº 335

**Autor:** RAFAEL ANTONIO SANTOS DA SILVA

**Título:** Padronização de bioensaios com *Lactuca sativa* L. e sua aplicação na avaliação toxicológica de efluentes contendo azocorantes tratados por Foto-fenton

**Banca examinadora:**

Profª. CENIRA MONTEIRO DE CARVALHO	Examinadora Externa ao Programa	_____
Prof. WAGNER ROBERTO DE OLIVEIRA PIMENTEL	Examinador Externo ao Programa	_____
Profª. CARMEM LUCIA DE PAIVA E SILVA ZANTA	Examinadora Interna	_____
Profª. DANIELA SANTOS ANUNCIACAO	Examinadora Interna	_____
Prof. JOSEALDO TONHOLO	Presidente	_____

Os itens abaixo deverão ser modificados, conforme sugestão da banca

1.  INTRODUÇÃO
2.  REVISÃO BIBLIOGRÁFICA
3.  METODOLOGIA
4.  RESULTADOS OBTIDOS
5.  CONCLUSÕES

**COMENTÁRIOS GERAIS:**

Declaro, para fins de homologação, que as modificações, sugeridas pela banca examinadora, acima mencionada, foram cumpridas integralmente.

**Prof. JOSEALDO TONHOLO**

Orientador



## RESUMO

Diferentes tipos de avaliações de toxicidade têm sido empregados, mas para alguns destes há necessidade de um investimento alto de capital, o que não é o caso dos bioensaios com plantas, os quais têm sido empregados com sucessos na verificação da toxicidade de diferentes substâncias, como por exemplo, os corantes sintéticos utilizados pela indústria têxtil que possuem em suas estruturas ligações triplas entre dois átomos de nitrogênios (azocorantes). Deste modo faz-se necessário padronizar e conhecer este ensaio que pode ajudar a prever os efeitos das substâncias industriais sobre os organismos vivos. Visando reduzir os impactos gerados por estas substâncias em meios como o de cultivos de hortaliças, várias metodologias estão sendo utilizadas, dentre elas destaca-se os processos oxidativos avançados (POAs) devido à alta eficiência do potencial oxidante dos radicais hidroxila ( $\cdot\text{OH}$ ), que possuem a capacidade de oxidar completamente maior parte dos contaminantes orgânicos, os convertendo em água,  $\text{CO}_2$  e íons inorgânicos. Assim, o objetivo deste trabalho é de padronizar os ensaios com o bioindicador *Lactuca sativa* L. (alface) a partir da avaliação de parâmetros abordados na literatura (tamanho das placas, quantidade de sementes, presença ou ausência de luminosidade, qualidade das sementes, quantidade do efluente utilizado neste teste e análise das concentrações dos íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{SO}_4^{2-}$ ) e a avaliação do efeito tóxico de três azocorantes reativos (laranja 122, amarelo 2R e vermelho 5B) tratado por processos oxidativos avançados (Foto-Fenton) e a aplicação em suas formas brutas. Os resultados obtidos em experimentos com as variáveis selecionadas na literatura para os bioensaios com alface foram gerados a partir de uma análise fatorial do tipo  $2^{4-1}$ . Destacaram-se tendências que foram refletidas em suas variáveis de resposta como o aumento da germinação em ambientes com a presença de luminosidade constante, aumento da radícula e parte aérea em ambientes com menor luminosidade e maior quantidade de efluente. Os efluentes brutos dos corantes apresentaram inibição significativa no alongamento das radículas das plântulas de alface, sendo esta análise estatística realizada pelo teste de Dunnett com significância de 5%. O processo Foto-Fenton apresentou alta eficiência de descoloração, sendo capaz de remover até 100% de coloração do Amarelo 2R, mas este tratamento para o Vermelho 5B apresentou uma inibição em todos os parâmetros quando aplicado com seu efluente não tratado. A partir deste teste percebeu-se inibições significativas, fazendo-se necessária uma análise detalhada do fator de acumulação das espécies químicas nas plântulas de alface, que será implementada em estudos posteriores.

**Palavras-chave:** Teste Ecotóxicológicos, Foto-Fenton, Bioensaios, alface



## ABSTRACT

Different types of toxicity assessments have been used, but for some of them there is a need for high capital investment, which is not the case with plant bioassays, which have been used with success in checking the toxicity of different substances, such as for example, the synthetic dyes used by the textile industry that have in their structures triple bonds between two nitrogen atoms (azodyes). Thus, it is necessary to standardize and understand this test, which can help predict the effects of industrial substances on living organisms. Aiming to reduce the impacts generated by these substances in environments such as vegetable cultivation, several methodologies are being used, among them the advanced oxidative processes (POAs) are highlighted due to the high efficiency of the oxidizing potential of hydroxyl radicals ( $\cdot\text{OH}$ ), which have the ability to completely oxidize most organic contaminants, converting them into water,  $\text{CO}_2$  and inorganic ions. Thus, the objective of this work is to standardize the assays with the bioindicator *Lactuca sativa* L. (lettuce) based on the evaluation of parameters covered in the literature (plate size, seed quantity, presence or absence of light, seed quality, quantity of the effluent used in this test and analysis of the concentrations of  $\text{Na}^+$  and  $\text{SO}_4^{2-}$  ions) and the evaluation of the toxic effect of three reactive azodyes (orange 122, yellow 2R and red 5B) treated by advanced oxidative processes (Photo-Fenton) and application in its raw forms. The results obtained in experiments with the variables selected in the literature for the lettuce bioassays were generated from a  $2^{4-1}$  factorial analysis. Trends that were reflected in their response variables were highlighted, such as increased germination in environments with the presence of constant luminosity, increased radicle and aerial part in environments with lower luminosity and greater amount of effluent. The raw effluents of the dyes showed significant inhibition in the elongation of the lettuce seedlings rootlets, and this statistical analysis was performed using the Dunnett test with a significance level of 5%. The Foto-Fenton process showed high decolorization efficiency, being able to remove up to 100% of the yellow 2R coloration, but this treatment for Red 5B showed an inhibition in all parameters when applied with its untreated effluent. From this test, significant inhibitions were noticed, making it necessary a detailed analysis of the accumulation factor of chemical species in lettuce seedlings, which will be implemented in further studies.

**Keyword:** Ecotoxicological test, Foto-Fenton, Bioassays, lettuce

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Análise gerada pela plataforma Scopus para a busca com título bioensaios nos últimos vinte anos.....	17
Figura 2. Análise gerada pela plataforma Scopus dos países que mais depositaram documentos ao longo dos últimos vinte anos com o termo bioensaio em seus títulos .....	18
Figura 3. Análise gerada pela plataforma Scopus para a busca com título bioensaios com alface nos últimos vinte anos.....	19
Figura 4. Estrutura química dos corantes reativos (a) Laranja 122, (b) Amarelo 2R, (c) Vermelho 5B/35 .....	23
Figura 5. Ciclo PDCA para elaboração de Métodos Científicos .....	33
Figura 6. Planejamento proposto por Montgomery (2012) para um design fatorial $2^3$ .....	33
Figura 7. Modelo de reator para o tratamento foto-Fenton e espectrofotômetro utilizados nas leituras de absorbância dos três monoazocorantes..	41
Figura 8. Detalhamento do processo foto-Fenton para o tratamento dos corantes selecionados .....	42
Figura 9. Gráfico do espectro gerado pelo Espectrofotometro UV-Vis Shimadzu para o corante reativo laranja 122 a uma concentração de 50mg/L	44
Figura 10. Gráfico do espectro gerado pelo Espectrofotometro UV-Vis Shimadzu para o corante reativo amarelo 2R a uma concentração de 50mg/L	44
Figura 11. Gráfico do espectro gerado pelo Espectrofotometro UV-Vis Shimadzu para o corante reativo vermelho 5B a uma concentração de 50mg/L .....	45
Figura 12. Procedimento da determinação da melhor cultivar de <i>Lactuca sativa</i> L. para a realização de bioensaios .....	46
Figura 13. Apresentação das variáveis de resposta (raiz e hipocótilo) .....	47
Figura 14. Apresentação das placas de Petri com a disposição das plântulas de alface após o período de incubação de 120 horas (5 dias) .....	51
Figura 15. Máximos e mínimos dos valores observados (médias ajustadas) das variáveis de controle em sua atuação na germinação de sementes de alface gerado pelo software estatístico Minitab 19 .....	52
Figura 16. Gráfico de Pareto gerado pelo software estatístico <i>Minitab 19</i> para os principais efeitos na germinação de sementes de alface a um nível de confiança de 95% .....	53
Figura 17. Máximos e mínimos dos valores observados (médias ajustadas) das variáveis de controle em sua atuação na germinação de sementes de alface gerado pelo software estatístico Minitab 19 .....	54
Figura 18. Gráfico de Pareto gerado pelo software estatístico <i>Minitab 19</i> para os efeitos no alongamento da raiz de sementes de alface a um nível de confiança de 95% .....	55
Figura 19. Máximos e mínimos dos valores observados (médias ajustadas) das variáveis de controle em sua atuação na germinação de sementes de alface gerado pelo software estatístico <i>Minitab 19</i> .....	55

Figura 20. Gráfico de Pareto gerado pelo software estatístico <i>Minitab 19</i> para os principais efeitos na germinação de sementes de alface a um nível de confiança de 95%.....	56
Figura 21. Esquema da germinação e crescimento morfológico de sementes na ausência e presença de luminosidade para sementes em placa de Petri.....	57
Figura 22. Boxplots para os diferentes ensaios em uma análise da variável comprimento da raiz.....	58
Figura 23. Boxplots para os diferentes ensaios em uma análise da variável comprimento da parte aérea. ....	58
Figura 24. Taxa de germinação das sementes da <i>Lactuca sativa</i> L. calculada	60
Figura 25. Comprimento da raiz das plântulas de alface em diferentes ensaios em milímetros.....	61
Figura 26. Comprimento da parte aérea das plântulas de alface em diferentes ensaios (mm).....	62
Figura 27. Crescimento da parte aérea das plântulas de alface em diferentes controles e diferentes concentrações do corante reativo laranja 122.....	65
Figura 28. Alongamento da raiz das plântulas de alface em diferentes controles e diferentes concentrações do corante reativo laranja 122.....	66
Figura 29. Crescimento da parte aérea das plântulas de alface em diferentes controles e diferentes concentrações do corante reativo amarelo 2R.....	69
Figura 30. Alongamento da raiz das plântulas de alface em diferentes controles e diferentes concentrações do corante reativo amarelo 2R.....	70
Figura 31. Crescimento da parte aérea das plântulas de alface em diferentes controles e diferentes concentrações do corante reativo vermelho 5B.....	72
Figura 32. Alongamento da raiz das plântulas de alface em diferentes controles e diferentes concentrações do corante reativo vermelho 5B.....	73
Figura 33. Monitoramento espectrofotométrico da degradação do corante reativo laranja 122 (corante: 50 mg/L, pH: 3, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> : 50 mg/L, peróxido de ferro II: 5 mg/L). ....	75
Figura 34. Monitoramento espectroscópico da degradação do corante reativo amarelo 2 (corante: 50 mg/L, pH: 3, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> : 50 mg/L, peróxido de ferro II: 5 mg/L).....	76
Figura 35. Monitoramento espectroscópico da degradação do corante reativo vermelho (corante: 50 mg/L, pH: 3, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> : 50 mg/L, peróxido de ferro II: 5 mg/L).....	76
Figura 36. Cinética reacional para degradação do azocorante reativo Laranja 122 pelo processo Foto-Fenton.....	77
Figura 37. Cinética reacional para degradação do azocorante reativo Amarelo 2R pelo processo Foto-Fenton.....	77
Figura 38. Cinética reacional para degradação do azocorante reativo Vermelho 5B pelo processo Foto-Fenton.....	78
Figura 39. Cinética de reação de 1 <sup>a</sup> e 2 <sup>a</sup> Ordem construído pela ferramenta Excel para o azocorante Laranja 122.....	79

Figura 40. Cinética de reação de 1ª e 2ª Ordem construído pela ferramenta Excel para o azocorante Amarelo 2R.....	80
Figura 41. Cinética de reação de 1ª e 2ª Ordem construído pela ferramenta Excel para o azocorante Vermelho 5B.....	80
Figura 42. Crescimento da parte aérea das plântulas de alface em diferentes controles e diferentes concentrações do corante reativo vermelho 5B (tratado).....	83
Figura 43. Alongamento da raiz das plântulas de alface em diferentes controles e diferentes concentrações do corante reativo vermelho 5B (tratado).....	84
Figura 44. Crescimento da parte aérea das plântulas de alface em diferentes controles e diferentes concentrações do corante reativo vermelho 5B (tratado).....	85
Figura 45. Alongamento da raiz das plântulas de alface em diferentes controles e diferentes concentrações do corante reativo vermelho 5B (tratado).....	86
Figura 46. Crescimento da parte aérea das plântulas de alface em diferentes controles e diferentes concentrações do corante reativo vermelho 5B (tratado).....	88
Figura 47. Alongamento da raiz das plântulas de alface em diferentes controles e diferentes concentrações do corante reativo vermelho 5B (tratado).....	89
Figura 48. Mecanismo da reação de degradação do Laranja 122 proposto por Raid e colaboradores (2018).....	92
Figura 49. Mecanismo da reação de degradação do Vermelho 5B/35 proposto por Bansal; Sud (2013).....	93

## LISTA DE TABELA

Tabela 1. Artigos científicos selecionados que realizaram por bioensaios com <i>Lactuca sativa</i> L. no período de 1999 a 2019.....	20
Tabela 2. Metodologias de referência utilizadas nos artigos coletados para a execução dos bioensaios com alface .....	21
Tabela 3. Vantagens e desvantagens gerais dos processos de tratamento de efluentes com corantes .....	25
Tabela 4. Reagentes e algumas de suas informações utilizados neste trabalho .....	34
Tabela 5. Equipamentos utilizados para aplicação das metodologias desse trabalho .....	35
Tabela 6. Metodologias e seus parâmetros de controle colhidos dos artigos selecionados da Tabela 1 .....	36
Tabela 7. Disposição dos fatores e níveis avaliados segundo referencial teórico que podem alterar na realização de bioensaios com alface .....	38
Tabela 8. Matriz de planejamento fatorial $2^{4-1}$ para bioensaios com <i>L. sativa</i> ..	39
Tabela 9. Quantidade de sementes germinadas e taxa de germinação para cada cultivar utilizada .....	49
Tabela 10. Parâmetros coletados no ensaio determinado pelo planejamento fatorial $2^{4-1}$ . Sendo A, B, C e D na ausência de luminosidade e E, F, G e H na presença de luminosidade .....	50
Tabela 11. Valores dos parâmetros de respostas coletados segundo experimento fatorial executado .....	59
Tabela 12. Parâmetros calculados pela ferramenta estatística GraphPad Prism 7 para a análise de variância a 95% de limite de confiança para os ensaios analisados para o comprimento das raízes das plântulas de alface .....	60
Tabela 13. Parâmetros calculados pela ferramenta estatística GraphPad Prism 7 para a análise de variância a 95% de limite de confiança para os ensaios analisados para o comprimento das partes aéreas das plântulas de alface.....	61
Tabela 14. Parâmetros calculados pela ferramenta estatística GraphPad Prism 7 para a análise de variância a 95% de limite de confiança para o alongamento da parte aérea .....	63
Tabela 15. Parâmetros calculados pela ferramenta estatística GraphPad Prism 7 para a análise de variância a 95% de limite de confiança para o alongamento da raiz .....	64
Tabela 16. Análise dos dados de alongamento da parte aérea (mm) da alface usando o teste de Dunnett para as diferentes concentrações do corante .....	64
Tabela 17. Análise dos dados de alongamento da raiz (mm) da alface usando o teste de Dunnett para as diferentes concentrações do corante .....	66
Tabela 18. Parâmetros calculados pela ferramenta estatística GraphPad Prism 7 para a análise de variância a 95% de limite de confiança para o alongamento da parte aérea .....	67

Tabela 19. Parâmetros calculados pela ferramenta estatística GraphPad Prism 7 para a análise de variância a 95% de limite de confiança para o alongamento da raiz .....	67
Tabela 20. Análise dos dados de alongamento da parte aérea (mm) da alface usando o teste de Dunnett para as diferentes concentrações do corante .....	68
Tabela 21. Análise dos dados de alongamento da raiz (mm) da alface usando o teste de Dunnett para as diferentes concentrações do corante .....	69
Tabela 22. Parâmetros calculados pela ferramenta estatística GraphPad Prism 7 para a análise de variância a 95% de limite de confiança para o alongamento da parte aérea .....	71
Tabela 23. Parâmetros calculados pela ferramenta estatística GraphPad Prism 7 para a análise de variância a 95% de limite de confiança para o alongamento da raiz .....	71
Tabela 24. Análise dos dados de alongamento da parte aérea (mm) da alface usando o teste de Dunnett para as diferentes concentrações do corante .....	72
Tabela 25. Análise dos dados de alongamento da raiz (mm) da alface usando o teste de Dunnett para as diferentes concentrações do corante .....	73
Tabela 26. Valores coletados para os ensaios com alface dos três azocorantes .....	74
Tabela 27. Índices de toxicidades para o bioensaio com alface.....	74
Tabela 28. Descoloração (%) e constantes cinéticas segundo modelo linear para a oxidação avançada dos efluentes aquosos sintéticos (Laranja 122, Amarelo 2R e Vermelho 5B) e têxtil (T = 30 °C).....	81
Tabela 29. Parâmetros calculados pela ferramenta estatística GraphPad Prism 7 para a análise de variância a 95% de limite de confiança para o alongamento da parte aérea .....	82
Tabela 30. Parâmetros calculados pela ferramenta estatística GraphPad Prism 7 para a análise de variância a 95% de limite de confiança para o alongamento da raiz .....	82
Tabela 31. Parâmetros calculados pela ferramenta estatística GraphPad Prism 7 para a análise de variância a 95% de limite de confiança para o alongamento da parte aérea .....	84
Tabela 32. Parâmetros calculados pela ferramenta estatística GraphPad Prism 7 para a análise de variância a 95% de limite de confiança para o alongamento da raiz .....	85
Tabela 33. Parâmetros calculados pela ferramenta estatística GraphPad Prism 7 para a análise de variância a 95% de limite de confiança para o alongamento da parte aérea .....	86
Tabela 34. Parâmetros calculados pela ferramenta estatística GraphPad Prism 7 para a análise de variância a 95% de limite de confiança para o alongamento da raiz .....	87
Tabela 35. Análise dos dados de alongamento da parte aérea (mm) da alface usando o teste de Dunnett para as diferentes concentrações do corante .....	87

Tabela 36. Análise dos dados de alongamento da raiz (mm) da alface usando o teste de Dunnett para as diferentes concentrações do corante .....	88
Tabela 37. Índices de toxicidades para o bioensaio com alface.....	90

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Condições para teste de germinação de sementes .....	63
--	----



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>16</b>
2.1 Geral.....	16
2.2 Específicos.....	16
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>17</b>
3.1 Bioensaios.....	17
3.2 Bioensaios com <i>Lactuca sativa</i> L. ....	18
3.3 Metodologias utilizadas em bioensaios.....	21
3.4 Corantes, azocorante e a legislação brasileira.....	23
3.5 Tratamento de Efluentes.....	24
3.5.1 Processos Oxidativos Avançados.....	26
3.5.1.1 Processos baseados na reação de Fenton e Foto-Fenton.....	27
3.6 Parâmetros de avaliação de degradação de compostos orgânicos.....	29
3.6.1 Espectrofotometria na região do ultravioleta-visível.....	29
3.6.2 Cinética de degradação.....	30
3.7 Planejamentos experimental.....	31
3.7.1 Elaboração de um planejamento fatorial $2^{k-1}$ para bioensaios com <i>L. sativa</i>	
32	
<b>4 METODOLOGIAS E MATERIAIS</b> .....	<b>34</b>
4.1. Reagentes.....	34
4.2 Equipamentos.....	34
4.3 Determinação das variáveis de controle e resposta.....	35
4.4 Elaboração da matriz experimental para bioensaios com alface.....	38
4.5 Tratamento por processos oxidativos avançados (Foto-Fenton) dos monoazocorantes.....	39
4.7 Métodos para avaliação degradativa dos corantes.....	43
4.7.1 Demanda Química de Oxigênio (DQO).....	43
4.7.2 Análise Espectrofotométrica.....	43
4.8 Bioensaios com alface ( <i>Lactuca sativa</i> L.) cultivar Betânia.....	45
<b>5 RESULTADOS E DISCURSÃO</b> .....	<b>49</b>

5.1 Fatores Aleatórios: Qualidade das sementes.....	49
5.2 Bioensaios e observação de variáveis de controle.....	49
5.3 Efeitos e Análise de Variância (ANOVA).....	51
5.3.1 Efeito na germinação .....	51
5.3.2 Efeito no alongamento da raiz e parte aérea (hipocótilo) .....	54
5.3.3 Análise de variância (ANOVA) no ensaio padrão com <i>Lactuca sativa</i> L. ....	57
5.4 Teste de Toxicidade dos corantes brutos com <i>Lactuca sativa</i> L. ....	63
5.4.1 Corante Reativo Laranja 122.....	63
5.4.2 Corante Reativo Amarelo 2R.....	67
5.4.3 Corante Reativo Vermelho 35/5B.....	70
5.5 Estudo de degradação dos azocorantes .....	75
5.6 Efluentes tratados por Foto-Fenton no bioensaio com alface .....	82
5.6.1 Laranja 122 .....	82
5.6.2 Amarelo 2R .....	84
5.6.3 Vermelho 5B/35 .....	86
5.7 Avaliação tóxicológica estimada das espécies formadas.....	90
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>94</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>95</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>103</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A humanidade a partir do início do século 21 se deparou com a escassez de água potável, é esta uma ameaça para toda vida do planeta. A falta deste líquido ocorre por fatores: políticos, econômicos e climáticos, os quais de acordo com a Organização das Nações Unidas – ONU (2018) pode fazer com que cerca de 40% da população mundial tenham que mudar sua forma de vida. As atividades domésticas e industriais geram um grande volume de resíduos sólidos e efluentes que são em sua maioria dispostos sem nenhum tratamento nos recursos naturais.

Os efluentes contendo poluentes, provenientes das mais diversas fontes e mesmo que em pequenas quantidades são capazes de alterar diversas características da composição química e biológica de um habitat (ALMEIDA, 2004). Diversos estudos têm sido realizados com intuito de desenvolver tecnologias que possam avaliar a toxicidade de diferentes grupos de efluentes, sendo estes os grandes responsáveis pela contaminação dos recursos hídricos disponíveis. Entre essas tecnologias estão os bioensaios, que são procedimentos com a finalidade de medir a resposta de organismos expostos a determinados contaminantes com intuito de observar sua toxicidade ou efeitos negativos em relação a um determinado controle (ARCY et al., 2008).

Os bioensaios são realizados após o efluente passar por um sistema de tratamento que envolve o uso de microalgas, de fungos ou mesmo os Processos Oxidativos Avançados (POAs). Os POAs reúnem um conjunto de técnicas que geralmente envolvem baixas temperaturas e elevadas pressões e têm sido empregados com sucesso no tratamento de uma gama de efluentes com toxicidade elevada (ARAUJO et al., 2016).

Bioensaios com plantas têm sido empregados com eficiência como bioindicadores para efluentes tratados e brutos, sendo estes um importante material para o monitoramento de diversos poluentes ambientais (FRANCO et al., 2017). A alface (*Lactuca sativa* L.) é uma espécie utilizada em bioensaios devido seu tempo de germinação ser curto, além de uma alta sensibilidade a fatores como pH e características da solução empregada (SIMÕES et al., 2013).

Na literatura é possível encontrar diversos tipos de materiais bibliográficos que listam bioensaios com alface, mas não existe um consenso entre as

metodologias, obtendo-se, diferentes resultados em função de qual foi utilizada. Torna-se assim, necessário criar um padrão eficaz e reprodutível, possível de ser utilizado por qualquer laboratório em suas atividades rotineiras com bioensaios. Além disto a padronização dos testes é necessária para averiguar a toxicidade dos efluentes oriundos de diversas fontes, e assim constatar a reutilização destes de forma apropriada.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Padronizar bioensaios que utilizam *Lactuca sativa* como bioindicador de compostos tóxicos originários de azocorantes.

### 2.2 Específicos

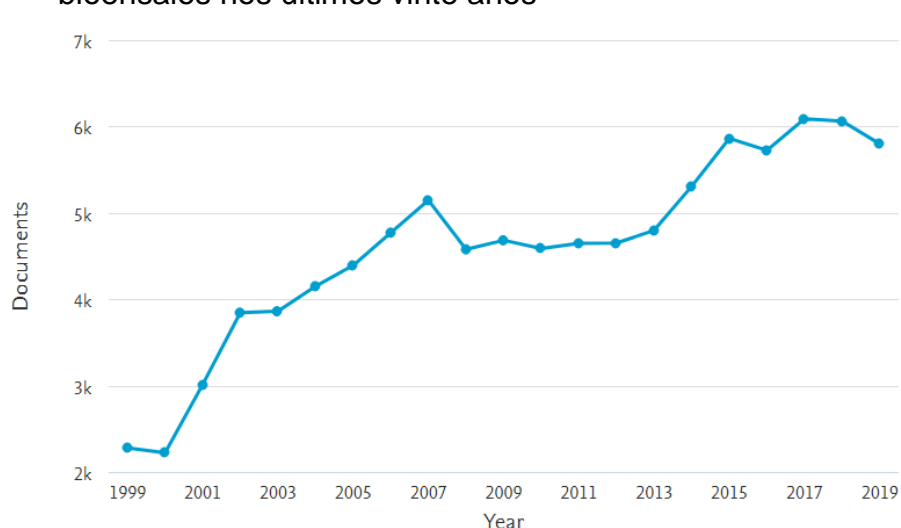
- Selecionar parâmetros avaliados em trabalhos científicos envolvendo bioensaios com *L. sativa*, como exemplo: tempo de incubação, tamanho da placa, quantidade de sementes, quantidades dos efluentes utilizados e metodologias empregadas durante o bioensaios;
- Caracterizar por técnicas físico-químicas os efluentes oriundos de azocorantes;
- Realizar tratamento de efluentes contendo corantes através POAs;
- Padronização os bioensaios com *L. sativa* utilizando os efluentes selecionados

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Bioensaios

Diferentes ensaios com seres vivos podem ser empregados para a detecção de toxicidade em diversos habitats. Segundo dados da plataforma SCOPUS entre os anos de 1999 e 2019 foram depositados em sua base de dados um total de 96.472 documentos científicos referentes a bioensaios com alface. O crescimento ao longo dos anos pode ser observado na Figura 1 gerada pela plataforma, e esta realça a importância que esse tema tem tomado no cenário global ao longo dos anos.

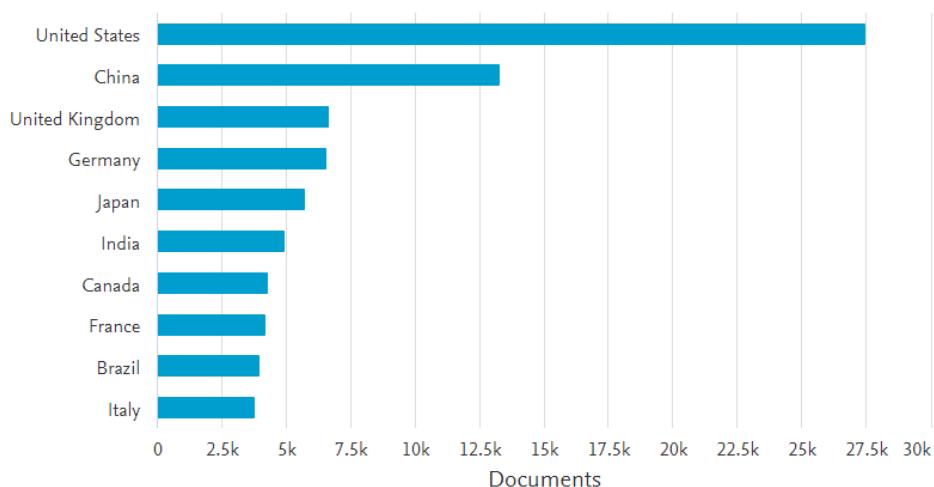
Figura 1. Análise gerada pela plataforma Scopus para a busca com título bioensaios nos últimos vinte anos



FONTE: Scopus, 2020.

Ainda de acordo com a Figura 1, o maior crescimento no interesse sobre este tema durante o período de 20 anos está entre os anos de 2017 a 2019, assim demonstrando que o mundo vive um momento atual em que assuntos relacionados ao meio ambiente têm se destacado cada vez mais. De acordo com essa plataforma, o Brasil é o 9º país que mais possui publicações depositadas durante esse período, sendo os Estados Unidos e a China os principais países que mais contribuíram para base com documentos com este assunto, isto pode ser observado conforme Figura 2.

Figura 2. Análise gerada pela plataforma Scopus dos países que mais depositaram documentos ao longo dos últimos vinte anos com o termo bioensaio em seus títulos



FONTE: Scopus, 2020.

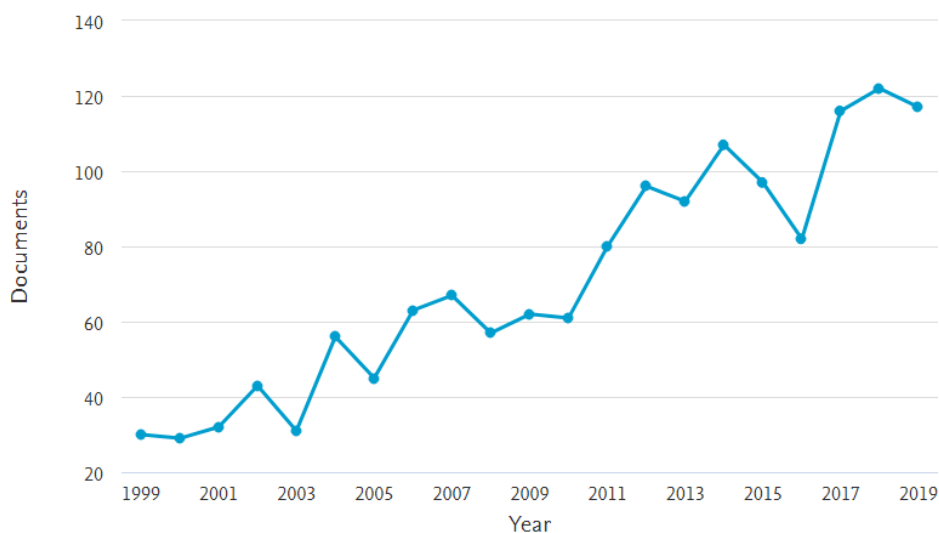
O notável volume de publicações dos Estados Unidos e China é muito superior, grandes potenciais globais de tecnologia têm se aperfeiçoados cada vez mais em temas de impacto no tratamento de seus resíduos para o reuso e destinado nos diferentes setores.

### 3.2 Bioensaios com *Lactuca sativa* L.

Dados de uma das bases de pesquisa de materiais científico mais utilizada (SCOPUS, 2019), revelam que, com o passar dos anos, é crescente a quantidade de materiais científicos que, de algum modo, utilizaram a alface em bioensaios com bioindicador (Figura 3). o crescimento no interesse desses temas pode estar diretamente ligado ao aumento de desastres ambientais que quase que rotineiramente tem ocorrido pelo mundo.

Além do teste com alface apresentar uma menor sensibilidade de detecção que outros bioensaios como *Daphnia pulex* e *Hydra vulgaris*. Ele é considerado simples (fácil aplicação) e de baixo uso de recursos, demonstrando alta sensibilidade a compostos inorgânicos e valores reprodutíveis comparáveis (FORGET et al., 2000).

Figura 3. Análise gerada pela plataforma Scopus para a busca com título bioensaios com alface nos últimos vinte anos



FONTE: Scopus, 2019.

Segundo Henz e Suinaga (2009) em seu comunicado técnico número 75, a alface tem seu período de plantio e colheita durante todo o ano. Esta hortaliça originária de climas temperados pertencente à família das Asteracea. Existem várias cultivares de alface que são plantadas no Brasil e estas são classificadas em cinco tipos morfológicos: Lisa, crespa, solta crespa e solta roxa, romana.

Durante os últimos 20 anos (1999 a 2019) os dados da literatura de 20 artigos podem ser comparados para execução de bioensaios. A escolha desses materiais de estudo originou-se a partir da presença de parâmetros descritos e avaliados (Tabela 1).



Tabela 1. Artigos científicos selecionados que realizaram por bioensaios com *Lactuca sativa* L. no período de 1999 a 2019 utilizando a base de dados SCOPUS e as palavras chaves Letuce e Bioassay.

Ano	Autor(es)	Parâmetros Avaliados					Parâmetros Descritos			
		TG	PA	RA	MS	MU	QE	TP	QS	AL
1999	NILSEN et al.	X	X	X			X	X	X	
2000	FORGET et al.	X	X	X	X		X	X	X	X
2001	RENOUX, A.Y.; TYAGI, R.D.; SAMSON, R.	X	X	X			X	X	X	
2002	VAAJASAARI, K. et al.	X	X	X		X	X	X	X	
2003	MOAWAD, H.; EL- RAHIM W. M. A.; KHALAFALLAH M.	X	X	X			X	X	X	
2004	EMINO, E. R.; WARMAN, P. R.	X	X	X			X	X	X	
2005	ARAÚJO, A. S. F.; MONTEIRO, R. T. R.	X	X	X			X	X	X	
2006	FJÄLLBORG, B.; GUSTAFSSON, N.	X	X	X			X	X	X	
2007	VALERIO, M. E.; García, J. F.; Peinado, F. M.	X	X	X	X	X	X	X	X	X
2008	OLIVEIRA, B.H.; et al.	X	X	X			X	X	X	
2009	GARCIA, et al.	X	X	X			X	X	X	
2010	GONZÁLEZ, et al.	X		X			X	X	X	
2011	CHARLES, et al.	X	X	X			X	X	X	
2012	TAMADA, et al.	X	X	X			X	X	X	
2013	RODRIGUES, et al.	X	X	X			X	X	X	
2014	GRANGEIRO, et al.	X	X	X			X	X	X	
2015	MUÑOZ, et al.	X	X	X	X		X	X	X	
2016	CAMPAGNA- FERNANDES, A.F.; MARIN, E.B; PENHA, T.H.F.L.	X	X	X			X	X	X	
2017	PRIAC, A.; BADOT, P-M.; CRINI, G.	X	X	X	X	X	X	X	X	
2018	CHAN-KEB, et al.	X	X	X			X	X	X	
2019	TAVARES et al.	X	X	X			X	X	X	

FONTE: Autor, 2020.

PA = Parte Aérea; RA = Raiz; TG = Taxa de Germinação; MS = Massa Seca; MU = Massa Unida; QE = Quantidade do Efluente; TP = Tamanho das Placas; QS = Quantidade de Sementes; AL = Ação Luminosa.

### 3.3 Metodologias utilizadas em bioensaios

Metodologias distintas são utilizadas corriqueiramente em experimentos que fazem uso de bioensaios para exprimir o potencial de toxicidade de diversos materiais. Na Tabela 2 estão dispostas as metodologias utilizadas como referências nos artigos coletados publicados entre 1979 a 2019, que fizeram a utilização com *L. sativa*.

Tabela 2. Referências de metodologias

Ano	Autor(es)	Títulos
1979	RICE, E. L.;	Allelopathy, an update. <i>Botanical Review</i> 45: 15–109.
1981	ZUCCONI, et al.	Evaluating toxicity of immature compost. <i>BioCycle</i> , 2(2):54-57.
1982	A.F.N.O.R.	AFNOR NFX31-201, 1982. Qualite´ des Sols—Essai d’Inhibition de Germination de Semences parune Substance.
1989	GREENE, et al.	Protocols for Short Term Toxicity Screening of Hazardous Waste Sites. EPA 600/3-88/029.
1989	DUTKA, B.;	Methods for Microbiological and Tóxicological Analysis of Waters, Wastewaters and Sediments; National Water Research Institute ŽNWRI.: Environment Canada.
1994	TAM, N.F.Y., TIQUIA, S.M.	Assessing toxicity of spent sawdust pig-litter using seed germination technique. <i>Resource Conservation Recycling</i> , v.11, p.261-274.
1996	EPA	Ecological effects test guidelines, OPPTS 850. 4200, Seed germination/root elongation toxicity tests. United States Environmental Protection Agency.
1977	HAMILTON, M. A.	RUSSO, R.C. & THURSTON, R.U. Trimmed Spearman-Karber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. <i>Environm Sci Technol.</i> , 11(7): 714-719.
1999	OECD	OECD Guidelines for the testing of chemicals, Lemna growth inhibition test - Draft, December.

---

 Continuação Tabela 2
 

---

2000	TIQUIA, S. M.	Evaluating phytotoxicity of pig manure from the pig-on-litter system. In: P.R. Warman and B.R. Taylor, Ed., <i>Proceedings of the Inter. Composting Symposium</i> , CBA Press Inc., Truro, NS., pp. 625-647.
2003	TORRES R. M. T.	Empleo de los ensayos con plantas en el control de contaminantes tóxicos ambientales. <i>Rev. Cubana Hig Epidemiol</i> ;41:2-3.
2003	ASTM E 1963-02	(American Society for Testing and Materials). Standard Guide for Conducting Terrestrial Plant Toxicity Tests.
2004	SOBRERO M.C.; RONCO, A.;	Tóxicologic Assay and Evaluation Methods of the Water Quality: Standardization, Intercalibration and Applications; Universidad do Chile: Santiago.

---

FONTE: Autor, 2019.

Organizações e grupos de pesquisas em todo o mundo realizam práticas com bioensaios e elaboram diferentes tipos de protocolos, alguns mais citados que outros, destacando-se como organização a US EPA – United States Environmental Protection Agency (1996) e em autores Zucconi, et al. (1981) e Sobrero e Ronco (2004) dentre os artigos observados. Outras organizações também cumprem o papel de regulamentação em outras partes do mundo, como a A.F.N.O.R. (Associação Francesa de Normatização) e OECD (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico).

Os ensaios podem ser empregados em diferentes tipos de ambientes, sejam aquáticos (hidropônico) ou terrestre (solo) com condições distintas. Plantio em solo exigem maiores cuidados na manipulação das plântulas de alface, para a retirada do substrato utilizado.

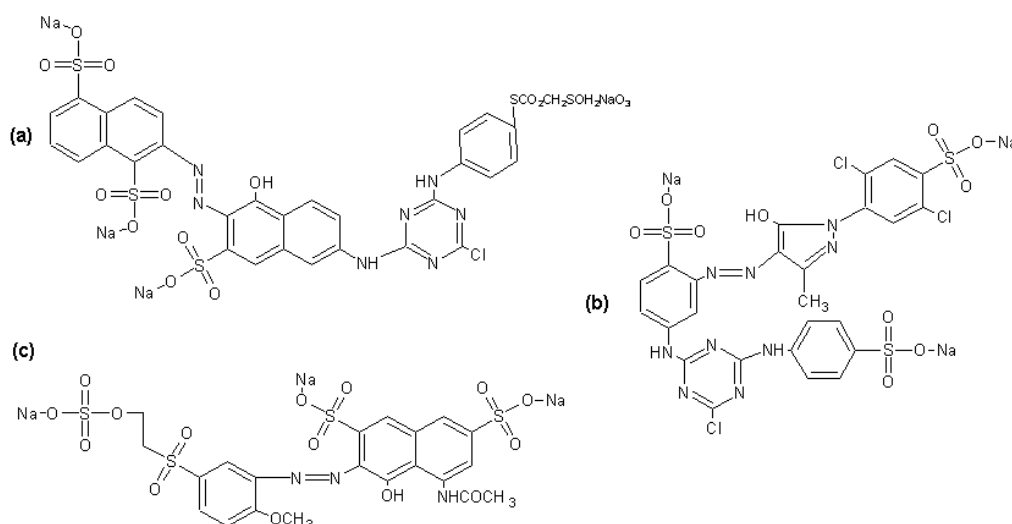
Muitos desses autores dividem os ensaios ecotóxicológicos em duas partes, sendo a primeira o teste de germinação, e o segundo o teste de alongamento da raiz e parte aérea das plântulas de alface.

### 3.4 Corantes, azocorante e a legislação brasileira

Corante são compostos com alta faixa de aplicação dentro do ramo industrial, se destacando os corantes sintéticos que vieram a ser utilizados em ascensão aos corantes naturais devidos seu baixo custo de produção. Existem diferentes classes de corantes que podem ser classificados por sua estrutura e aplicação, os quais dentre eles se destacam os azocorantes por sua grande aplicabilidade para colorir em diversos ramos.

Este grupo de corantes possui em sua estrutura um grupamento (-N=N-) cromóforo, principal responsável pela cor exibida por esses compostos, o qual está ligado a um carbono  $sp^2$ . Estes podem ser classificados de acordo com o número de grupamentos azo, sendo monoazo, disazo, trisazo, e alguns outros. A sua síntese ocorre via diazotização, a qual resulta em uma estrutura altamente conjugada conferindo a estes uma enorme palheta de cores a serem tomadas pela indústria para pintura de diferentes bens (ZANONI; YAMANAKA, 2016). A Figura 4 apresenta as estruturas química dos três monoazocorantes que serão usados neste trabalho.

Figura 4. Estrutura química dos corantes reativos (a) Laranja 122, (b) Amarelo 2R, (c) Vermelho 5B/35



Fonte: Autor, 2020.

De acordo com Zanoni; Yamanaka (2016) em seu livro “Corantes – caracterização química, toxicológica, métodos de detecção e tratamento”, a

indústria tem grande interesse nestes corantes devido a sua ampla variabilidade de cores e tonalidades, alto grau de pureza, controle da cor e maior fixação ao material exposto. Porém devido à grande quantidade de processos envolvidos no sistema têxtil, muitos dos materiais utilizados são descartados sem tratamento adequado colocando todo um ecossistema em risco, assim sendo, há necessidade de ferramentas cada vez mais eficientes na detecção e monitoramento de substâncias contaminantes.

Devido a simplicidade em não necessitar de materiais sofisticados para sua realização, bioensaios com plantas para a detecção de substâncias tóxicas não possuem uma regulamentação vigente no Brasil, esta prática está sempre associada ao reuso de resíduos gerados pela indústria (efluentes e lodo). Órgão como o Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA), Conselho Nacional de Recursos Hídricos (CNRH) e a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), estabelecem diretrizes para o descarte e de forma menos completa para o reuso desses materiais.

A resolução CONAMA Nº 430/2011 é a mais utilizada quando necessita-se falar sobre o descarte de efluentes, esta saiu em complemento a resolução Nº 357/2005, trazendo consigo parâmetros e diretrizes para o lançamento de efluentes e algumas alterações a resolução anterior. Nesta resolução são listados e classificadas padrões de águas e suas destinações, assim como valores máximos de composto que podem ser descartados.

### **3.5 Tratamento de Efluentes**

Devido aos frequentes e críticos problemas ambientais em viés ao aumento da população mundial e das atividades por ela desenvolvida, tem-se buscado por meios de tornar os rejeitos dessas atividades reusáveis ou adequado para descarte. A indústria têxtil tem se destacado pela grande quantidade de processos de fabricação e de tecnologias empregadas, que são atreladas a um grande consumo de água. Os resíduos dessas atividades apresentam composição heterogênea com grande quantidade de material tóxico e recalcitrante que dificulta em seu tratamento (NAGEL-HASSEMER et al., 2012).

Para garantir que os produtos finais no tratamento de efluentes que possuem corantes estão dentro dos padrões previsto na legislação do CONAMA é importante definir quais processos ou conjuntos de processos serão empregados de acordo com as características disponíveis, conhecendo bem a composição de cada produto formado e a eficiência de cada tratamento. Na Tabela 3 é possível verificar as vantagens e desvantagens pertinentes a cada um dos processos químicos, físicos e biológicos no tratamento de efluentes têxteis.

Tabela 3. Vantagens e desvantagens gerais dos processos de tratamento de efluentes com corantes

<b>Método</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
Peróxido de Hidrogênio	É um oxidante ambientalmente amigável	Não é efetivo para todas as classes de corantes, pois seu potencial de oxidação não é muito alto
Reação de Fenton Foto-Fenton	Descoloração efetiva e até mineralização de corantes solúveis e insolúveis, pois gera radicais hidroxila. A água pode até ser reusada após o tratamento	Geração de lodo e faixa ideal de pH para ser efetivo é estreita (2.0 a 3.0) o que pode ser melhorado pelo uso de complexos de ferro.
Ozonização	Aplicado em fase gasosa: sem alteração de volume. Muito eficiente para remoção de cor.	Tempo de meia-vida curto (20 min), não efetivo na mineralização e forma ácidos carboxílicos como produtos de degradação
Fotoquímico NaOCl	Não há produção de lodo Inicia e acelera rompimento de ligações azo, rápida descoloração, mais barato que outros oxidantes e facilmente aplicável	Formação de subprodutos Risco de formação de hidrocarbonetos clorados e aumento de toxicidade
Degradação eletroquímica	Compostos gerados não são perigosos	Alto custo de energia
Carvão ativado	Boa remoção de grande variedade de corantes	Alto custo

Filtração por membrana	Remove todos os tipos de corantes	Produção de lodo concentrado
Continuação Tabela 3		
Irradiação UV	Oxidação efetiva em escala de laboratório, remove metais pesados. Combinação com um fotocatalisador, ozônio ou $H_2O_2$ é eficiente, pois gera radicais hidroxila	São necessárias altas concentrações de $O_2$ dissolvido, gera lodo e há problema devido ao espalhamento de irradiação UV
Degradação biológica	Alternativa econômica e eficiente na aplicação prática, trata efluentes de altas concentrações	Muitos corantes são estáveis e resistentes ao ataque microbiológico, mas o isolamento e adaptação de micro-organismos pode aumentar a eficácia da biorremediação.

Fonte: adaptado de Zanoni ; Yamanaka (2016).

### 3.5.1 Processos Oxidativos Avançados

Em virtude da necessidade de um tratamento que demonstre eficiência com azocorantes e que possa atender aos níveis exigidos pela legislação em vigor, várias novas tecnologias vêm sendo desenvolvidas, dentre elas então os processos oxidativos que são os mais usados, devido sua simples aplicabilidade, tendo como principais agentes oxidantes o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o hipoclorito de sódio ( $NaClO$ ) e o ozônio ( $O_3$ ).

Segundo Nagel-Hassemer et al. (2012), os POAs são identificados pela geração de radicais oxidantes altamente reativos em solução, a partir da combinação de diferentes oxidantes com uma fonte de irradiação, dando destaque ao radical hidroxila ( $\bullet OH$ ), que devido sua baixa seletividade ataca a maioria das moléculas orgânicas presentes. Sendo este um processo destrutivo, onde os contaminantes são degradados através de uma série de reações.

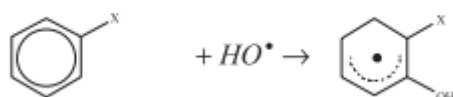
Os processos mais comuns são Fenton ( $H_2O_2$  e  $Fe^{2+}$ ); Foto-Fenton; Eletro-Fenton; Fotocatálise heterogênea com  $TiO_2$  ou outros catalisadores na

presença de luz solar ou ultravioleta (UV), a ozonização que pode ser realizada com junção de outros sistemas como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, radiação UV e catalisadores; e a peroxidação (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) que pode ser feita juntamente com a ação da radiação (JÍMENEZ et al., 2018).

De acordo com Melo et al. (2009) os radicais formados podem reagir de diferentes formas com as substâncias contaminantes, e isso depende da estrutura do composto. Hidrocarbonetos alifáticos são susceptíveis a reações de **abstração de hidrogênio**, gerando radicais orgânicos (Equação 1) que se ligam ao oxigênio molecular (Equação 2) gerando radicais peróxido, que iniciam reações oxidativas em cadeia fazendo com que o substrato orgânico se degrade em CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O e sais inorgânicos.



Compostos orgânicos que contêm ligações π (insaturados e aromáticos) reagem preferencialmente por **substituição**, formando radicais orgânicos segundo Equação 3.



Equação 3

Para hidrocarbonetos halogenados ou com alto impedimento estérico, os mecanismos de reação supracitados são desfavorecidos e predomina a **transferência eletrônica** conforme equação 4.



### 3.5.1.1 Processos baseados na reação de Fenton e Foto-Fenton



É notável a grande versatilidade dos processos oxidativos avançados no que se compete a realizar a degradação de contaminantes, mas o grande destaque vai para o Fenton, no qual radicais hidroxila são gerados pela decomposição de  $\text{H}_2\text{O}_2$  na presença de íons  $\text{Fe}^{2+}$  em meio ácido, onde os íons  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$  existem na forma de aquo/hidroxo complexos, cuja sua presença depende diretamente do pH conforme Equação 5 (MELO et al., 2009).



Ainda segundo Melo et al. (2009) o pH dessa reação desempenha papel muito importante na eficiência deste processo, uma vez que valores de pH acima de 3,0 fazem com que o  $\text{Fe}^{3+}$  precipite na forma de hidróxido insolúvel. Já para valores abaixo de 2,5, a presença de alta concentração de  $\text{H}^+$  em solução pode agir como sequestrador de radicais hidroxila como forma demonstrada na Equação 6.



A reação de Fenton ocorre de forma muito rápida e é diretamente proporcional ao consumo de peróxido de hidrogênio, porém o excesso desse reagente em relação a concentração da espécie  $\text{Fe}^{2+}$  pode causar o sequestro de radicais hidroxila formando o radical hidroperoxila ( $\text{HO}_2^{\cdot}$ ) que possui um menor potencial de redução (1,42V) que o radical  $\text{HO}^{\cdot}$  (2,73V), diminuindo a eficiência desta reação como pode ser visto na Equação 7 (ZANONI; YAMANAKA, 2016).



Devido a rápida velocidade desta reação a concentração de  $\text{Fe}^{2+}$  diminui muito e com isso a velocidade da reação também diminui, uma vez que a decomposição do peróxido de hidrogênio por  $\text{Fe}^{3+}$  é muito mais lenta do que por  $\text{Fe}^{2+}$  e isso contribui muito pouco para a regeneração das espécies desta reação.

A irradiação dos complexos nesta solução faz com que um elétron de um orbital centrado no ligante seja promovido a um orbital centrado no metal,

resultando na redução do  $\text{Fe}^{3+}$  em  $\text{Fe}^{2+}$  e oxidando o ligante conforme Equação 8. Este processo denominado Foto-Fenton aumenta a eficiência desta reação, regenerando o  $\text{Fe}^{2+}$  para reagir novamente com o  $\text{H}_2\text{O}_2$  e produzindo novos radicais hidroxila adicionais aos da equação 5 (MELO et al., 2009).



### 3.6 Parâmetros de avaliação de degradação de compostos orgânicos

#### 3.6.1 Espectrofotometria na região do ultravioleta-visível

A Cor que desenvolve parâmetro importante na comercialização dos corantes também é um dos principais pontos observados no tratamento de efluente que os contem e degradação da matéria orgânica presente. Existem diversas técnicas utilizadas na quantificação de corantes, dentre elas tem-se os métodos espectrofotométricos, com as técnicas de espectroscopia UV-Vis, infravermelho, Raman, Elisa e Plasma. A espectrofotometria UV-Vis é tida como uma técnica simples, rápida e de baixo custo (ZANONI; YAMANAKA, 2016).

Esta técnica pode ser utilizada separando-se ou não os corantes na matriz. É uma técnica que auxilia na quantificação de corantes artificiais e, através de análises matemáticas, é possível obter de maneira rápida e prática a concentração de cada um dos compostos (QUEIJA et al., 2001). A mesma consiste na incidência de radiação contínua em uma amostra, onde uma parte dessa radiação pode vir a ser absorvida, e se isto ocorre, esta radiação gera o espectro de adsorção podendo variar entre 200 a 800 nanômetros.

Nesta técnica é a lei de Lambert-Beer-Bouguer que estabelece a relação entre a absorbância de uma solução e sua concentração, quando essa atravessada por uma radiação monocromática colimada. De acordo com Lima (2013), a absorbância ( $A$ ), corresponde ao simétrico do logaritmo decimal do inverso da transmitância ( $T$ ), a qual é quociente entre potência radiante de saída e a da entrada, respectivamente  $P_{\lambda}^{\circ}$  e  $P_{\lambda}$ , assim como mostrados na equação 9 e 10. Sendo assim, a lei Lambert-Beer-Bouguer é traduzida pela equação 11 na qual  $c$  representa a concentração molar da espécie em solução ( $\text{mol}\cdot\text{m}^{-3}$ ),  $l$  é a

distância percorrida pela radiação através da solução (m) e  $\epsilon$  o coeficiente de absorção molar da espécie em estudo ( $\text{m}^2\text{mol}^{-1}$ ).

Equação 9

$$T = \frac{P\lambda}{P\lambda^\circ}$$

Equação 10

$$A = \log\left(\frac{P\lambda}{P\lambda^\circ}\right) = -\log T = \log\left(\frac{1}{T}\right)$$

Equação 11

$$A = \epsilon lc$$

### 3.6.2 Cinética de degradação

A cinética química é a ciência que estuda a velocidade das reações químicas com o envolvimento de diferentes variáveis que a influenciam, como a temperatura, pressão, concentração, propriedades do catalisador caso venha a realizar o uso deste, grau de mistura, dentre outros. Esse estudo tem como foco principal atender a dois objetivos, o primeiro deles é desenvolver um mecanismo plausível para a reação e o segundo é a obtenção de uma equação ou sistema de equações diferenciais e algébricas que juntas definem as leis de velocidade de todas as etapas da reação (SILVEIRA, 2015).

De acordo com a ordem de reação, que é a quantidade de número de átomos ou de moléculas as quais as concentrações sofreram mudanças (aumento ou diminuição) durante a reação, ou seja, que determinaram a velocidade da reação, é possível classificar estas reações como primeira ordem, segunda, terceira, e demais ordens. A ordem da reação é dada pela soma dos expoentes da equação de velocidade, por exemplo,  $v = k [A]^x \cdot [B]^y$ , onde a ordem global é  $n = x + y$  (SILVEIRA, 2015).

Na reação de ordem zero a velocidade da reação não depende da concentração dos reagentes e é descrita pela Equação 12. Na reação de primeira ordem a velocidade é determinada pela concentração de um único termo como expresso na Equação 13. Nas reações de segunda ordem a velocidade é determinada pela concentração de dois termos como observado pelas Equações 14 e 15.

$$r = k \quad \text{Equação 12}$$

$$r = kC_A \quad \text{Equação 13}$$

$$r = kC_A^2 \quad \text{Equação 14}$$

$$r = kC_A \cdot kC_A \quad \text{Equação 15}$$

### 3.7 Planejamentos experimental

O acerto ou o erro na realização de um experimento está diretamente ligado ao seu planejamento, implantação e condução. Existindo diferentes tipos de fatores que podem influenciar diretamente na realização de experimento apropriado. Na parte experimental é corriqueiramente utilizado uma análise fatorial, onde são feitas combinações dos níveis de fatores estudados. Estes tipos de experimentos têm-se mostrado úteis em pesquisas agrícolas, industriais e biológicas (YASSIN, 2001).

Experimentos fatoriais possuem como informação principal a análise das interações de diferentes fatores, ou seja, se há diferença significativa entre as respostas dos diferentes níveis de cada fator. As interações podem apresentar-se como positivas ou negativas, o que as tornam mais difíceis de detectar e analisar os seus efeitos (PERECIN; CARGNELUTTI FILHO, 2008).

Assim faz-se necessário destacar alguns termos que autores como: Galdámes (2002) e Percin e Cargnelutti Filho (2008) utilizam na elaboração desta análise. São eles:

**Fatores de controle:** Esses são alterados de acordo com a forma de interesse na abordagem experimental, com intuito de avaliar possíveis efeitos nas variáveis de resposta e assim determinar principais fatores do processo, podendo ser quantitativos ou qualitativos.

**Variáveis de resposta:** Variáveis as quais assumem comportamento diferenciado de acordo com estímulo introduzido pelos fatores de controle, que gerenciam o procedimento.

**Níveis dos fatores:** São as circunstâncias as quais os fatores de controle são submetidos.

**Tratamentos:** Representa as combinações dos diferentes níveis dos fatores de controle.

**Matriz de experimento:** Planejamento criado para gerir os experimentos. Estão contidos neles informações como: fatores de controle, níveis e os tratamentos.

**Aleatoriedade:** É comum em determinados experimentos a presença de erros aleatórios. Essa aleatoriedade, dar-se pelo fato de existir variáveis que não são controláveis.

### 3.7.1 **Elaboração de um planejamento fatorial $2^{k-1}$ para bioensaios com *L. sativa***

Antes da realização deste tipo de análise, faz-se necessária a realização de alguns passos, os quais segundo Anjos (2005) e Galdámez (2002), são a base para essa construção. Esta construção segue um ciclo conhecido como ciclo PDCA que tem em sua composição palavras como *Plan, Do, Check and Action* (plano, fazer, checar e agir) sendo exibido na Figura 5.

Assim, o PDCA pode ser expandido de forma a que se torne mais fácil a condução dos experimentos em oito pontos, sendo eles:

- 1) Conhecer o tema e definir os objetivos do experimento analisado;
- 2) Coletar de informações sobre o processo;
- 3) Selecionar os fatores de controle e variáveis de resposta;
- 4) Elaborar de uma matriz experimental;
- 5) Realizar os experimentos;
- 6) Analisar os dados obtidos;
- 7) Tratamento e compreensão dos resultados;
- 8) Elaborar relatórios.

Figura 5. Ciclo PDCA para elaboração de Métodos Científicos



Fonte: Adaptado de Anjos, 2005.

De posse desta construção, torna-se mais simples ao pesquisador/analista desenvolver e tratar os seus dados. Autores como Montgomery (2012) e Ramos (2018) utilizam o planejamento disposto na Figura 6 para ilustrar como deve ser realizada a análise fatorial  $2^3$  para um caso geral, exibindo a disposição de suas variáveis e como segue cada um de seus tratamentos.

Figura 6. Planejamento proposto por Montgomery (2012) para um design fatorial  $2^3$ .

Run	Factor		
	A	B	C
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	-
5	-	-	+
6	+	-	+
7	-	+	+
8	+	+	+

Fonte: Montgomery, 2012.

(+) Nível superior/Maior valor; (-) Nível inferior/Menor valor.

## 4 METODOLOGIAS E MATERIAIS

### 4.1. Reagentes

Em sua maioria, os reagentes utilizados neste experimento são da classe PA (Para Análise), os quais apresentam maior grau de pureza, sendo assim, uma melhor lealdade aos resultados esperados. Os reagentes utilizados estão organizados na Tabela 4, assim como algumas de suas informações.

Tabela 4. Reagentes e algumas de suas informações utilizados neste trabalho

Reagentes	Fórmula Química	Marca	Concentração	Massa Molar (g/mol)
Sulfato de ferro heptahidratado	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Dinâmica	99% P.A.	278,01
Peróxido de hidrogênio	$\text{H}_2\text{O}_2$	Cinética	34% P.A.	34,01
Hidróxido de sódio	$\text{NaOH}$	Vetec	98% P.A.	40,00
Sulfato de mercúrio	$\text{HgSO}_4$	Vetec	98% P.A.	296,65
Sulfato de prata	$\text{Ag}_2\text{SO}_4$	Vetec	99% P.A.	311,80
Dicromato de potássio	$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	Vetec	99% P.A.	294,18
Ácido sulfúrico	$\text{H}_2\text{SO}_4$	Synth	98% P.A.	98,08
Laranja 122	-	ExataCor	-	-
Amarelo 2R	-	ExataCor	-	-
Vermelho 5B	-	ExataCor	-	-

Fonte: Autor, 2020.

### 4.2 Equipamentos

Os equipamentos utilizados neste trabalho estão dispostos na Tabela 5.

Tabela 5. Equipamentos utilizados para aplicação das metodologias desse trabalho

<b>Equipamento</b>	<b>Marca</b>
Espectrofotometro UV-Vis	Shimadzu
Balança analítica	Mettler
Digestor Demanda Química de Oxigênio	PoliControl
Medidor de pH	Hanna
Banho Ultra-som	Unique
Termômetro	Hidrautech
Agitador magnético	Corning
Estufa de secagem	Quimis
Radiômetro	Delta Ohm

Fonte: Autor, 2020.

### **4.3 Determinação das variáveis de controle e resposta**

A determinação das variáveis seguiu de acordo com o proposto por Montgomery (2012), estas variáveis foram colhidas dos artigos citados na Tabela 1, onde obteve-se como variáveis de controle: tamanho das placas de Petri, quantidade de efluente utilizado, luminosidade e a quantidade de sementes. Como variáveis de resposta obteve-se taxa de germinação, alongamento da radícula e parte aérea das plântulas de alface. Na Tabela 6 estão organizadas as metodologias e valores dos parâmetros utilizados.



Tabela 6. Metodologias e seus parâmetros de controle colhidos dos artigos selecionados da Tabela 1

ANO	METODOLOGIA	DIMENSÃO DA PLACA DE PETRI (mm)	QUANTIDADE DE SEMENTES	VOLUME TESTADO (mL)	QUANTIDADE DE REPETIÇÕES	PERIODO DE IMCUBAÇÃO (Horas)
1981	ZUCCONI et al.	100	20	10,00	3	120
1984	OECD	120	40	**	5	120
1989	US EPA	150	40	**	**	120
1996	US EPA	90	15	5,00	2	120
2002	ASTM E1963-02	**	10	2,00	4	120
2004	SOBRERO, M. C.	100	20	4,00	3	120
2005	A.F.N.O.R.	100	15, 20 e 30	4,00	3	168
2007	VARNERO, M. T.; et al.	**	10	10,00	4	96
2008	LALLANA, M. C.; et al.	**	20	3,00	4	24
2010	CANDIDO, A. C. S.; et al.	**	10	2,00	**	120

## Continuação da Tabela 6

2012	PÉREZ, G. P.; et al.	90	20	3,00	3	120
2012	WANG, M.; et al.	90	10	4,00	2	120
2012	RIBEIRO, L. O.; et al.	90	30	3,00	3	**
2017	VIANA, L. O.; et al.	90	15	4,00	3	120
2017	SILVEIRA, G. L.; et al.	90	30	3,00	3	120

---

Fonte: Autor, 2020.

#### 4.4 Elaboração da matriz experimental para bioensaios com alface

Definidas as variáveis que serão analisadas neste estudo, o passo subsequente, assim como exemplificado por Anjos (2005) e Galdámez (2002), foi a construção da matriz de planejamento para o ensaio padrão com *L. sativa*. Deste modo, neste trabalho foi realizada uma análise fatorial para o estudo das interações entre diferentes fatores em diferentes níveis para bioensaios com alface, onde na maioria das vezes os resultados/respostas de um fator depende de um ou mais níveis de outros fatores.

Quatro fatores de controles foram selecionados em dois diferentes níveis. Sendo estes a quantidade de sementes utilizadas, tamanho das placas de Petri e luminosidade e quantidade de solução, o que resultou em um total de 8 combinações de ensaios gerados pela ferramenta estatística *Minitab 19*, esta organização está exposta nas Tabelas 7 e 8.

Neste trabalho foi utilizado um planejamento experimental  $2^{4-1}$ , para determinar as condições ótimas dos três parâmetro de resposta que este ensaio exhibe. Sendo analisado um menor nível (-1) o qual representa os menores valores ou a não presença de algum fator e um maior nível (+1) com valores máximos observados ou a presença destes fatores.

Tabela 7. Disposição dos fatores e níveis avaliados segundo referencial teórico que podem alterar na realização de bioensaios com alface

Fatores	Nível	
	(-1)	(+1)
Quantidade de sementes dispostas	10 sementes	15 sementes
Tamanho das placas de Petri	90mm	100mm
Luminosidade	Ausência	Presença
Quantidade de Solução	5mL	7mL

Fonte: Autor, 2019.

A escolha das variáveis levou em consideração a busca bibliográfica realizada anteriormente para a construção do referencial deste trabalho, a qual resultou na elaboração das Tabelas 8 que apresenta os principais fatores de importância em bioensaios com alface.

Tabela 8. Matriz de planejamento fatorial  $2^{4-1}$  para bioensaios com *L. sativa*

N° Ensaio	Fator de Controle			Ordem do teste	Respostas (Yi)
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>		
1	10 sementes	90mm	Ausência	6	Y1
2	15 sementes	90mm	Ausência	8	Y2
3	10 sementes	100mm	Ausência	2	Y3
4	15 sementes	100mm	Ausência	1	Y4
5	10 sementes	90mm	Presença	3	Y5
6	15 sementes	90mm	Presença	5	Y6
7	10 sementes	100mm	Presença	7	Y7
8	15 sementes	100mm	Presença	4	Y8

Fonte: Autor, 2019.

As médias das respostas de cada uma das variáveis foram avaliadas através da análise de variância (ANOVA) utilizando o software estatístico Graphpad Prism 7, a um nível de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ) de acordo com o teste da razão F ( $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$ ).

#### 4.5 Tratamento por processos oxidativos avançados (Foto-Fenton) dos monoazocorantes

Para a realização deste tratamento foi necessário em primeiro caso a busca por informações do reagente a serem tratados como sua estrutura, identificação de grupamentos, compatibilidade com o pH da reação de Fenton e quantidade necessária de sulfato de ferro heptahidratado e peróxido de hidrogênio necessária para essa reação.

A otimização desta reação em azocorantes foi realizada de acordo com o proposto por Neamtu et al., (2003). Onde em seu trabalho verificou diferentes variações de proporção de  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  na efetividade do tratamento foto-Fenton, onde as proporções utilizadas foram 1:7, 1:10, 1:15 e 1:20 de  $\text{FeSO}_4$ :  $\text{H}_2\text{O}_2$  aplicados em seus tratamentos, o qual observou a partir de uma análise de variância que as taxas 1:10, 1:15 e 1:20 não apresentaram diferença significativa em seus resultados. Deste modo, foi determinada a proporção 1:10 (5mg/L  $\text{FeSO}_4$ : 50mg/L  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) para realização deste tratamento dos três azocorantes pela reação foto-Fenton.

A solução de peróxido de Hidrogênio estava em uma concentração 34% (m/m) apresentando uma densidade mínima de 1,11 g/mL e sua massa molar de

34,01 g/mol, sendo o volume necessários calculado pela Equação 16 com demonstrado abaixo:

$$\text{Densidade do Peroxido de Hidrogênio} = \frac{\text{Massa do Peroxido de Hidrogênio}}{\text{Volume de Peroxido de Hidrogênio}} \quad \text{Equação 16}$$

O valor obtido de massa estava em uma concentração de 34%, tendo como massa 0,01g para 50 mg/L de Peróxido de Hidrogênio. Para obter o valor em 100% montou-se uma regra de três como demonstrado a seguir:

$$\begin{array}{l} 0,05 \text{ ----- } 1\text{L} \\ X \text{ ----- } 0,2\text{L} \end{array}$$

$$X = 0,01\text{g em } 34\% \text{ de Peróxido de Hidrogênio}$$

$$\begin{array}{l} 0,01 \text{ ----- } 34\% \\ X \text{ ----- } 100\% \end{array}$$

$$X = 0,0294\text{g em } 100\% \text{ de Peróxido de Hidrogênio}$$

O volume de Peróxido de Hidrogênio obtido a partir Equação 16 para uma concentração de 50mg/L foi de 0,0265mL. Para o Sulfato de Ferro (FeSO<sub>4</sub>) que possui massa molar de 278,02 g/mol a massa necessária foi calculada com base na Equação 17 a massa necessária para a proporção escolhida, sendo ela 5mg/L de acordo com o planejado por Xu et al. (2004) e Alaton; Teksoy (2007).

$$[\text{Sulfato de Ferro}] (\text{mol/L}) = \frac{\text{Massa do FeSO}_4 (\text{g})}{\text{MM do FeSO}_4 \left(\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right) \times \text{Volume (L)}} \quad \begin{array}{l} \text{Equação} \\ 17 \end{array}$$

A solução de ácido sulfúrico utilizada para controlar o pH desta reação foi preparado para uma concentração de 0,1mol/L em um balão volumétrico de 100mL. O ácido sulfúrico estava em uma concentração de 95%(m/v) este possui massa molar de 98,079 g/mol e densidade de 1,84g/cm<sup>3</sup>. O cálculo seguiu demonstrado como foi definido o volume requerido para o preparo desta reação:

$$0,1\text{mol} \times 98,079 \text{ g/mol} = \text{Massa do ácido em gramas} = 0,98079\text{g}$$

$$1,84 \times 0,95 = 1,7664\text{g em } 1\text{mL}$$

$$1,7664\text{g} \text{ ----- } 1\text{mL}$$

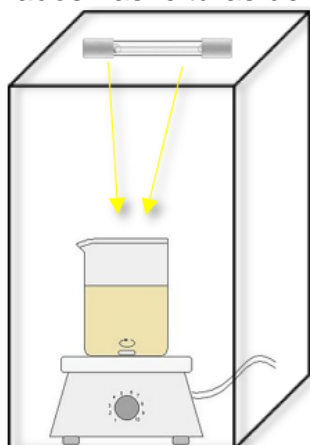
0,98079g ----- X

X = 0,555mL de ácido sulfúrico em 100mL

Fez o uso do reagente de Fenton, à base de sulfato de ferro heptahidratado e peróxido de hidrogênio sob a ação da radiação ultravioleta conferida por uma lâmpada. O efluente utilizado foi preparado com uma concentração de 50 mg/L, para sua posterior diluição. Foi utilizada água destilada por razão da concentração de água de abastecimento público variar muito em seus compostos.

As reações de degradação foram realizadas em um reator de 200 mL com agitação continua para a com retiradas de alíquotas nos tempos 5, 10, 20, 30 e 40 minutos para a leitura de sua absorvância conforme Figura 8, sob a ação de uma lâmpada ultravioleta Philips HPL-N 80 W. Neste tratamento foram utilizados os três monoazocorantes reativos, laranja 122, amarelo 2R e vermelho 5B/35 para simular um efluente real e seu pH ajustado/controlado em torno de 3,0 conforme descrito para esta reação com o auxílio da solução de ácido sulfúrico (0,1 mol/L).

Figura 7. Modelo de reator para o tratamento foto-Fenton e espectrofotômetro utilizados nas leituras de absorvância dos três monoazocorantes



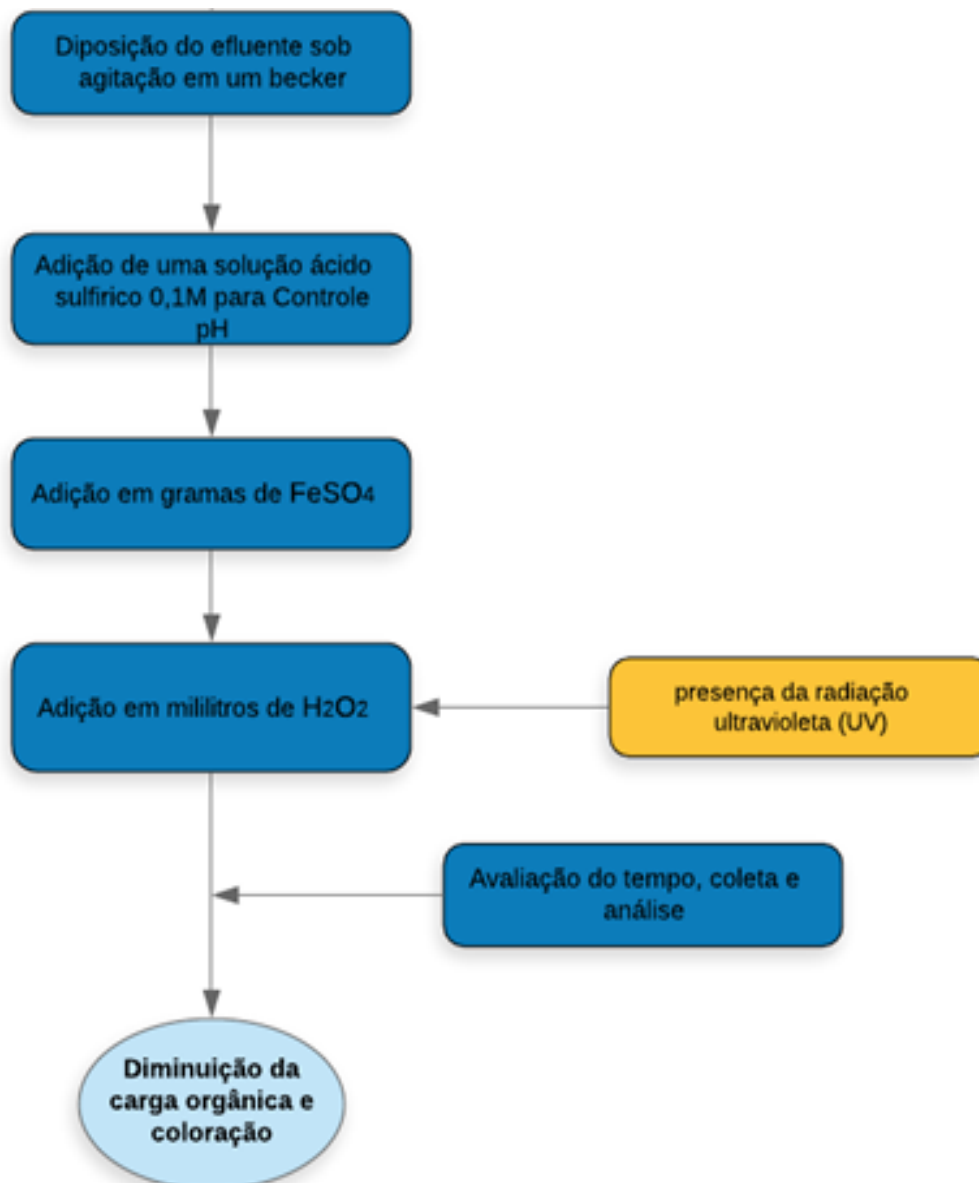
Fonte: Autor, 2020.



Após o ajuste do pH foram adicionados o sulfato ferro heptahidratado e em seguida o peróxido de hidrogênio ocorrendo sob a presença luminosa, dando início ao período reacional que ocorreu durante 40 minutos, esse tempo foi estipulado levando em consideração a remoção da cor da solução dos corantes

avaliados. Este detalhamento pode ser acompanhado de forma mais nítida pela Figura 8.

Figura 8. Detalhamento do processo foto-Fenton para o tratamento dos corantes selecionados



Fonte: Autor, 2020.

## **4.7 Métodos para avaliação degradativa dos corantes**

### **4.7.1 Demanda Química de Oxigênio (DQO)**

A preparação das soluções utilizadas na Análise de Demanda Química de Oxigênio (DQO) seguiu-se:

Para a solução digestiva foram introduzidos 3,3 g de sulfato de mercúrio a um balão volumétrico de 100 mL. Adicionou-se ao mesmo 16,7 mL de ácido sulfúrico. Em seguida a mistura foi submetida a ultrassom, para acelerar a solubilização do sulfato de mercúrio no ácido. Em béquer, introduziu-se 1,02 g de dicromato de potássio em balança semi-analítica. Adicionou-se uma pequena quantidade de água destilada suficiente para a dissolução do dicromato. Acrescentou-se o dicromato dissolvido à solução de sulfato de mercúrio. Homogeneizou-se a solução e completou-se o volume com água destilada.

Para a solução catalisadora introduziu-se 0,88 g de sulfato de prata a um balão volumétrico de 100 mL. Adicionaram-se aproximadamente 70 mL de ácido sulfúrico. Levou ao ultrassom durante 15 minutos, para acelerar a solubilização do sulfato de prata. Homogeneizou-se e completou-se o volume da solução com ácido sulfúrico concentrado.

As análises da DQO, foram determinadas, no início e no final da reação, através do método colorimétrico. De acordo com este método, no tubo de digestão específico para esta análise foram adicionados 2,5 mL da amostra, 1,5 mL da solução digestora e 3,5 mL da solução catalisadora. Em seguida os tubos de digestão foram fechados e invertidos cuidadosamente, para homogeneização da solução e logo após levados para digestão em um bloco digestor por 2 horas à temperatura de 150 °C.

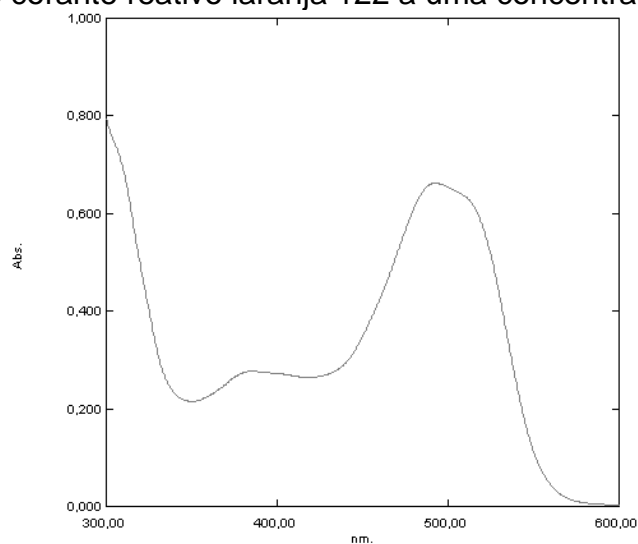
### **4.7.2 Análise Espectrofotométrica**

Para monitorar a redução da coloração do efluente e avaliar a eficiência do processo na oxidação, foram realizadas análises espectrofotométricas medindo a absorvância da solução em função do tempo de reação. O espectro de varredura permite a visualização da banda de absorção dos corantes reativos Laranja 122; Amarelo 2R e Vermelho 5B/35, onde as alturas de suas bandas são Laranja 122 (493nm), Amarelo 2R (421,50nm) e o Vermelho 5B/35 (541,00 e



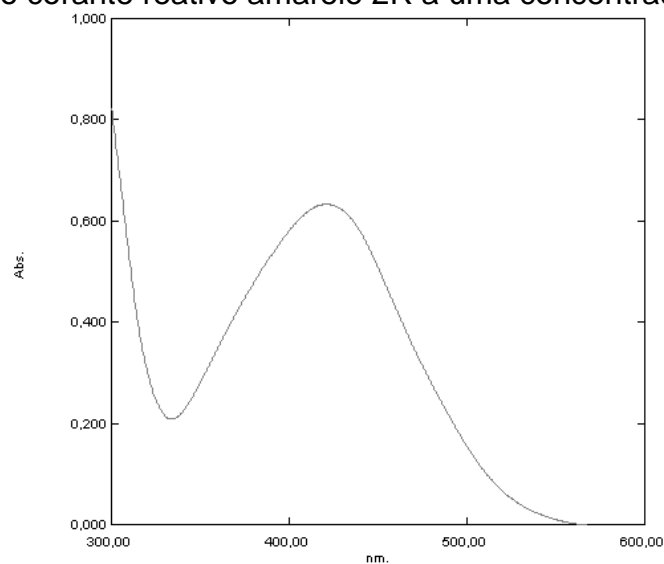
516,50) conforme Figuras 10,11 e 12. Estando estas relacionada com a concentração no meio e sua redução indica a degradação do grupo azo cromóforo e aromático.

Figura 9. Gráfico do espectro gerado pelo Espectrofotometro UV-Vis Shimadzu para o corante reativo laranja 122 a uma concentração de 50mg/L



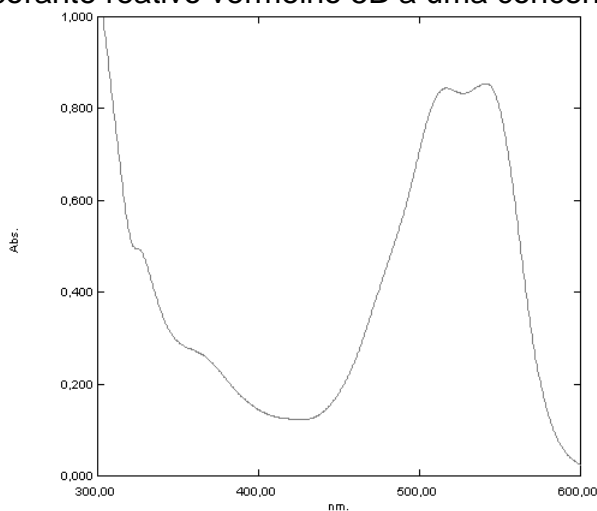
Fonte: Autor, 2020.

Figura 10. Gráfico do espectro gerado pelo Espectrofotometro UV-Vis Shimadzu para o corante reativo amarelo 2R a uma concentração de 50mg/L



Fonte: Autor, 2020.

Figura 11. Gráfico do espectro gerado pelo Espectrofotometro UV-Vis Shimadzu para o corante reativo vermelho 5B a uma concentração de 50mg/L



Fonte: Autor, 2020.

#### 4.8 Bioensaios com alface (*Lactuca sativa* L.) cultivar Betânia

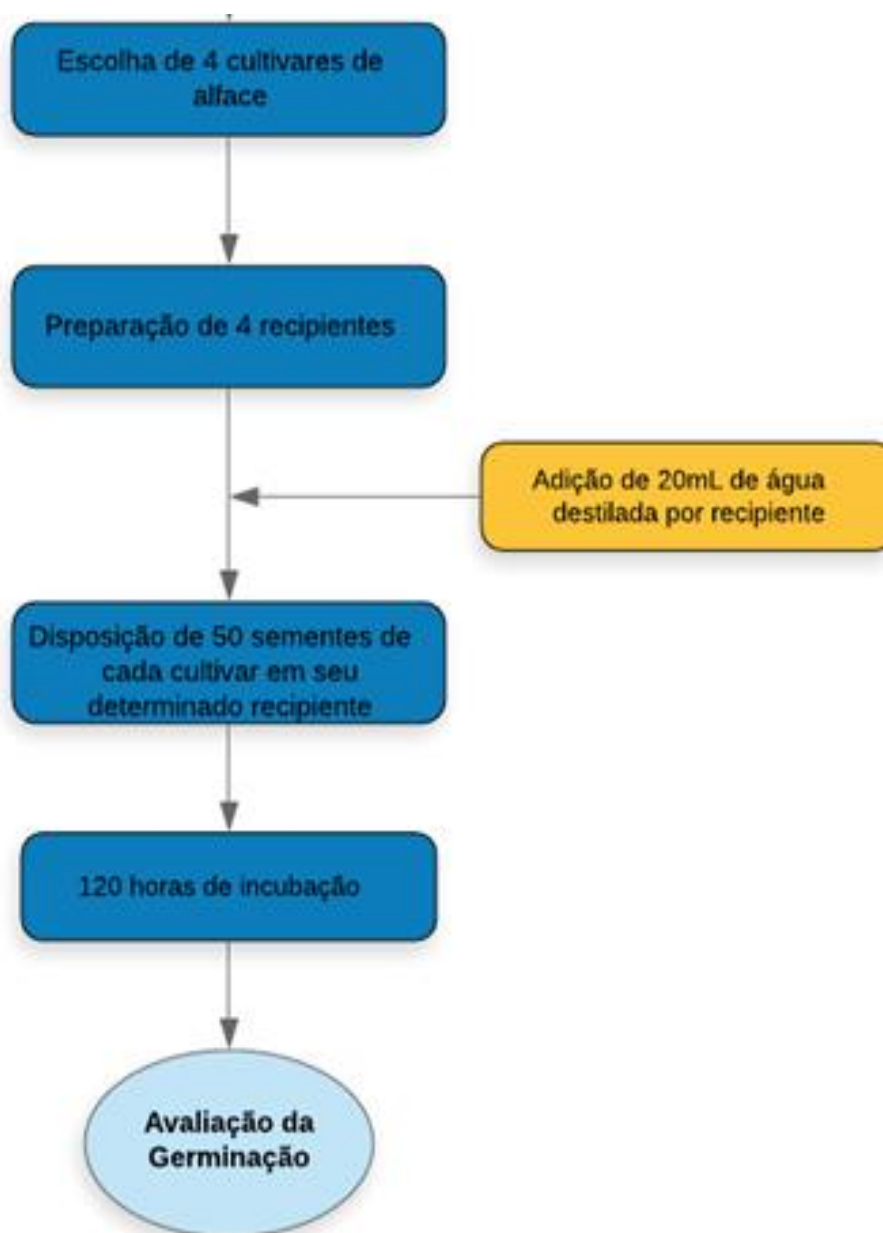
Para a padronização deste bioensaio, foram selecionadas quatro cultivares diferentes de alface, sendo elas conhecidas como: Grandes Lagos Americana, Betânia, Manteiga e Romana Luíza, adquiridas comercialmente em um estabelecimento de produtos agropecuários. A cultivar de alface que apresentou melhor resultado de germinação, foi selecionada, de acordo com o ensaio realizado detalhado pelo fluxograma da Figura 12.

Após o período de 120 horas, que é o tempo estimado para se observar a germinação da alface segundo Sobrero e Roncon (2004), foram calculadas as taxas de germinação para cada uma das cultivares analisadas neste experimento. Estas taxas foram obtidas pela Equação 18 descrita abaixo:

Equação 18

$$\text{Taxa de Germinação} = \frac{\text{Total de sementes} - \text{Sementes não germinadas}}{\text{Total de sementes}} \times 100\%$$

Figura 12. Procedimento da determinação da melhor cultivar de *Lactuca sativa* L. para a realização de bioensaios



Fonte: Autor, 2019.

O teste de toxicidade foi conduzido de acordo com o a junção dos melhores parâmetros retirados das metodologias apresentadas na Tabela 2. Para realização dos ensaios, foram feitas diluições com água destilada das amostras do efluente tratado e bruto. As diluições testadas foram de 100%, 75%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25% e 0% (controle, água destilada). Deste modo, o experimento foi realizado em placa de Petri previamente lavadas e esterilizadas

com álcool 70° INPM (Instituto Nacional de Pesos e Medidas) e secas em estufa a 100°C por uma hora. Após esse processo em cada placa foi disposto um papel filtro para que a quantidade de efluente ficasse bem distribuída e as sementes não se locomovessem, logo em seguida com auxílio de uma pipeta adicionado a quantidade de efluente pré-definido. Após adicionar à solução as sementes de alface da cultivar escolhida foram distribuídas uniformemente, em seguida as placas foram fechadas e nomeadas, este experimento foi realizado em três réplicas para cada concentração do efluente bruto e tratado e respectivos controles. As placas foram mantidas em caixas térmicas sob temperatura constante ( $\pm 25^{\circ}\text{C}$ ) durante um período de cinco dias, e após esse período retiradas para a verificação de sua germinação, alongamento da radícula e parte aérea (hipocótilo) apresentados na Figura 13. O índice de germinação foi obtido por meio de contagem, e o crescimento radicular e do hipocótilo foram medidos com o auxílio de um paquímetro digital.

Figura 13. Apresentação das variáveis de resposta (raiz e hipocótilo)



Fonte: Autor, 2020.

#### 4.9 Análise gráfica e comportamental

O uso de ferramentas gráficas ajuda a visualizar e extrair informações importante sobre determinados dados, descartando problemas e limitações de certos processos, esta tem sido uma prática estatística de análise de dados crescente. O boxplot é uma dessas ferramentas na qual os dados são dispostos

em uma caixa (box) retangular e neste são observadas tendências químicas e físicas.

Muitas pessoas acreditam que a estatística avalia apenas dados quantitativos de um processo. Em certos casos não é tão simples extrair informações apenas com valores, em certos casos, como o deste trabalho analisar tendências pode vir a definir fator crucial na identificação de anomalias no desenvolvimento da *Lactuca sativa* L.

A construção do boxplot foi realizada a partir dos dados brutos, nenhum tratamento estatístico, tendo como dados germinação, tamanhos de raízes e partes aéreas das plântulas de alfaces. Autores enfatizam a ferramenta estatística Origin lab 2019b como um bom software para a análise estatística, plotagem e modelagem de funções.

O teste de comparação de média escolhido para esta análise foi o de Dunnett, que pode ser aplicado toda vez que se pretende comparar médias dos tratamentos com o controle (OLIVEIRA, 2008).

## 5 RESULTADOS E DISCURSÃO

### 5.1 Fatores Aleatórios: Qualidade das sementes

Na Tabela 9 é possível verificar o número de sementes germinadas e a taxa de germinação calculada para cada uma das cultivares utilizadas neste ensaio. Deste modo percebeu que a cultivar Betânia apresentou uma maior taxa de germinação, sendo ela selecionada para a continuidade dos bioensaios.

Tabela 9. Quantidade de sementes germinadas e taxa de germinação para cada cultivar utilizada

Cultivar	Sementes germinadas	Taxa de germinação (%)
Grandes Lagos	38	76
Betânia	49	98
Manteiga	35	70
Romana Luiza	28	56

Fonte: Autor, 2019.

Este experimento foi realizado com a finalidade de diminuir os erros associados em bioensaios posteriores, uma vez, que há uma grande possibilidade da ocorrência de erros aleatórios que envolvem a fisiologia destes cultivares. Optou-se por esse viés, já que não se pode garantir a total qualidade das sementes utilizadas.

### 5.2 Bioensaios e observação de variáveis de controle

A realização do ensaio se deu de acordo com o proposto no item 4.8 para as variáveis de controle selecionadas. As médias para o alongamento das raízes variaram entre 5,4mm a 6,8mm nas placas mantidas sem a presença de luz e entre 3,6mm a 10,5mm com presença. Já para o alongamento do hipocótilo as médias para a ausência de luminosidade ficaram entre 10,3mm a 15,4mm e entre 3,3mm a 7,4mm com presença. A menor taxa de germinação foi observada nas placas com a ação contínua de luminosidade, sendo essa de 66,7%. Essas variações indicam que possivelmente a presença de luz possa ter causado um maior efeito nestas respostas. O estudo desses efeitos será abordado em tópicos

a seguir. Na Tabela 10 se encontram os valores coletados nesse ensaio em um planejamento fatorial  $2^{4-1}$ .

Tabela 10. Parâmetros coletados no ensaio determinado pelo planejamento fatorial  $2^{4-1}$ . Sendo A, B, C e D na ausência de luminosidade e E, F, G e H na presença de luminosidade

<b>Parâmetro/Ensaio</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>	<b>F</b>	<b>G</b>	<b>H</b>
Médias Raiz (mm)	6,8	14,5	5,6	5,4	6,0	10,5	3,6	5,0
Médias Hipocótilo (mm)	10,3	15,4	11,6	13,1	5,3	7,4	3,3	4,9
Desvio Padrão raiz	5,67	9,47	2,73	2,89	8,11	8,52	2,44	3,11
Desvio Padrão hipocótilo	6,54	7,28	5,18	5,47	5,63	3,46	2,32	2,53
C.V. raiz (%)	68,47	54,37	33,92	44,13	96,45	73,64	29,25	40,37
C.V. hipocótilo (%)	46,41	33,48	28,57	30,66	66,40	36,82	30,41	28,80
Germinação (%)	86,7	91,1	90,0	93,3	66,7	93,3	73,3	88,9

Fonte: Autor, 2020.

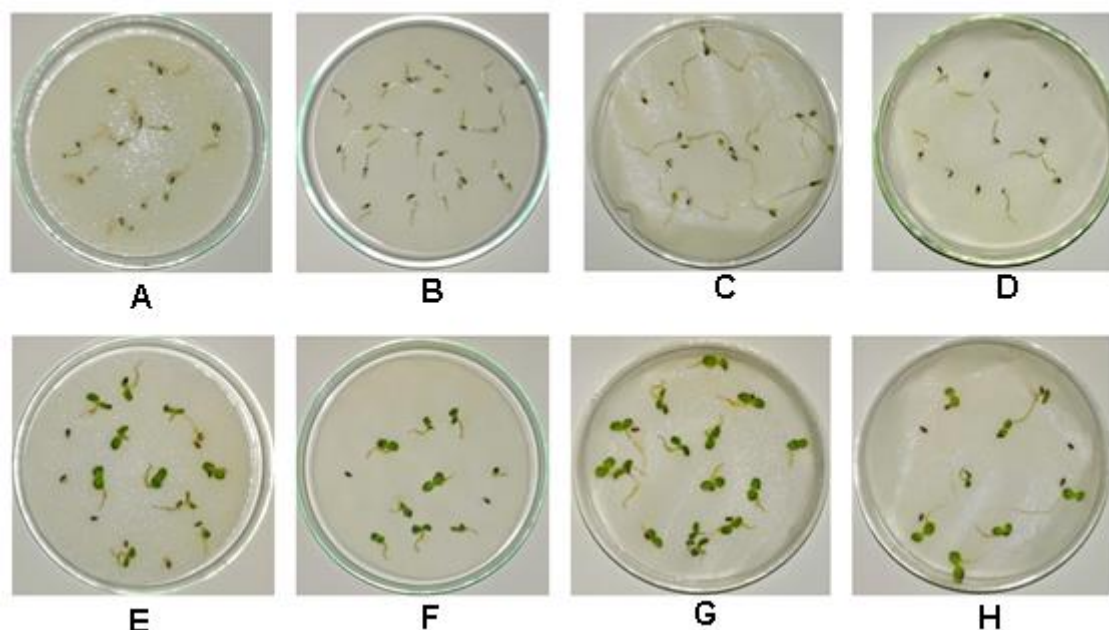
Onde: A – 90 milímetros, 10 sementes e 5 mL; B – 90 milímetros, 15 sementes e 7 mL; C – 100 milímetros, 10 sementes e 7 mL; D – 100 milímetros, 15 sementes e 5 mL; E – 90 milímetros, 10 sementes e 7 mL; F – 90 milímetros, 15 sementes e 5 mL; G – 100 milímetros, 10 sementes e 5 mL; H – 100 milímetros, 15 sementes e 7mL

Menezes et al. (2000) revelam que as sementes de alface em seu processo germinativo podem ter influência por uma interação entre temperatura e luz.

De acordo com Fonseca (2016, apud CASTRO et al., 2005) as sementes de alface só germinam, ou germinam em maior porcentagem, quando submetidas à presença de luz, sendo assim consideradas sementes do tipo fotoblásticas positivas. Porém, com a domesticação e ampla produção, muitas cultivares já perderam esse fotoblastismo passando a ser fotoblásticas neutras.

Os coeficientes de variação (C.V.) foram classificados de acordo com o proposto por Garcia (1989), em baixo ( $CV \leq m - 1s$ ), médio ( $(m - 1s) \leq CV \leq (m + 1s)$ ), alto ( $(m + 1s) < CV \leq (m + 2s)$ ), e muito alto ( $CV > (m + 2s)$ ), onde  $s$  é o desvio padrão e  $m$  a média. De acordo com essa classificação todos os coeficientes de variação obtidos nestes ensaios são muito altos com  $CV > (m + 2s)$ , variando entre 29,25 a 96,45 para raiz e entre 28,47 a 66,40 para o hipocótilo. Na Figura 14 estão presentes uma placa de cada triplica deste ensaio. As quatro primeiras placas (A-D) foram executadas na ausência de luminosidade e as quatro ultimas (E-H) com luminosidade.

Figura 14. Apresentação das placas de Petri com a disposição das plântulas de alface após o período de incubação de 120 horas (5 dias)



Fonte: Autor, 2020

Em sua pesquisa Schimdt et al. (2017) revelaram que o coeficiente de variação muito alto em experimentos com alface, tiveram os seguintes índices para a comprimento da raiz e à altura do hipocótilo,  $CV > 26,82$  e  $CV > 10,90$ , respectivamente.

### 5.3 Efeitos e Análise de Variância (ANOVA)

#### 5.3.1 Efeito na germinação

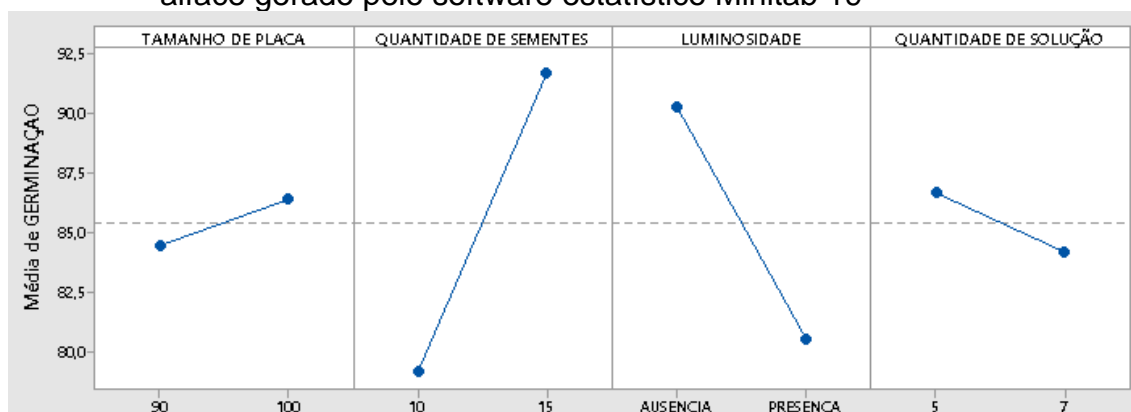
Segundo Floriano (2004) a dormência é uma estratégia evolutiva das espécies que bloqueia a germinação protegendo as sementes de deterioração, as mantendo vivas por um maior tempo. Essa dormência pode ser classificada como física, química, mecânica, morfológica e fisiológica. Nas sementes de alface a água desenvolve fator importante na quebra dessa dormência com sua absorção por infiltração, ocorre a reidratação dos tecidos e a intensificação da respiração e retomada de todas atividades necessária para o fornecimento de energia e nutriente que propiciam o crescimento pelo eixo embrionário.

O primeiro parâmetro de resposta dessa análise é a germinação, esta foi calculada de acordo com o observado nas placas de cada um dos ensaios do planejamento experimental. Na Figura 15 é possível observar como os máximos



e mínimos de como cada uma das variáveis de controle atuaram na taxa de germinação deste ensaio, sendo a quantidade de sementes e luminosidade a apresentar comportamento mais inclinado a uma de suas variáveis de controle.

Figura 15. Máximos e mínimos dos valores observados (médias ajustadas) das variáveis de controle em sua atuação na germinação de sementes de alface gerado pelo software estatístico Minitab 19

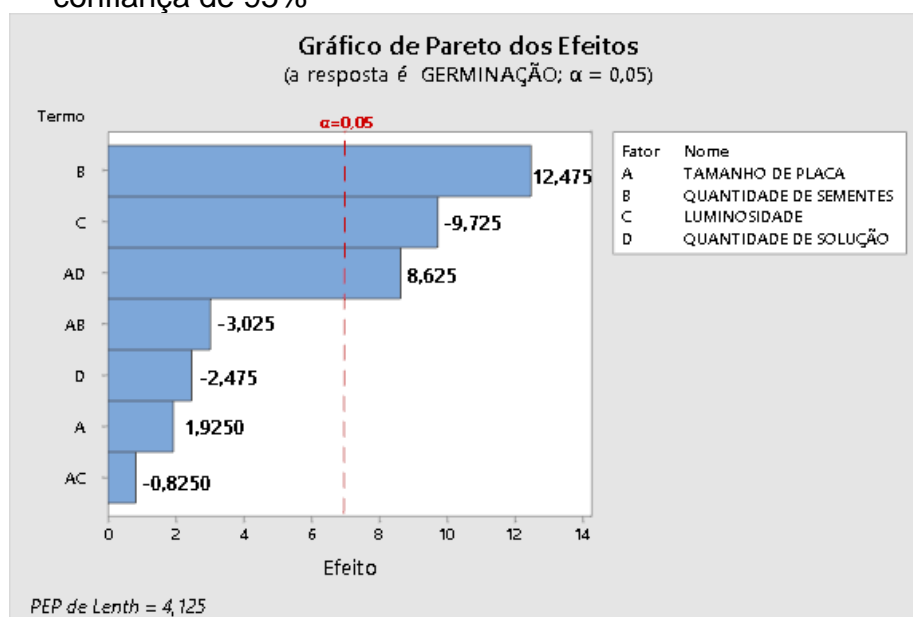


Fonte: Autor, 2020.

A Figura 16 apresenta os efeitos principais e associação das variáveis de controle na germinação das sementes, esse efeito é expressado pelo gráfico de Pareto, esse traça uma linha para destacar quais os principais fatores se sobressaíram em relação a outros a um nível de confiança de 95% ( $\alpha=0,05$ ). Essa análise destacou que o fator quantidade de sementes apresentou um efeito de positivo de 12,475 indicando que a germinação apresenta um maior desenvolvimento neste fator e luminosidade como o fator que contribuiu com um efeito negativo de -9,725, onde houve uma diminuição da germinação pela ação luminosa incidida.

Alguns tipos de sementes de alface não germinam se não forem expostas à luz, pois o fitocromo presente no eixo embrionário pode ser ativado ou desativado pela radiação luminosa. A forma ativa do fitocromo, possibilita o desempenho de várias funções relacionadas ao processo germinativo, como ativar genes responsáveis pela mobilização de reservas para o embrião (DIAS, 2014).

Figura 16. Gráfico de Pareto gerado pelo software estatístico *Minitab 19* para os principais efeitos na germinação de sementes de alface a um nível de confiança de 95%



Fonte: Autor, 2020.

No tempo inicial de germinação, ou seja, no primeiro dia é onde ocorre o deslocamento da radícula, iniciando sua germinação, sendo essa a primeira informação coletada para esta análise (COELHO, 2018). O efeito da luminosidade na germinação da alface foi estudado por Bufalo e colaboradores (2012), o qual indica que algumas cultivares de alface não germinam se não forem expostas à luz (fotoblasto positivo), efeito o qual não é observado para a cultivar estudada neste trabalho, resultando em uma maior germinação na ausência de luz (fotoblasto negativo).

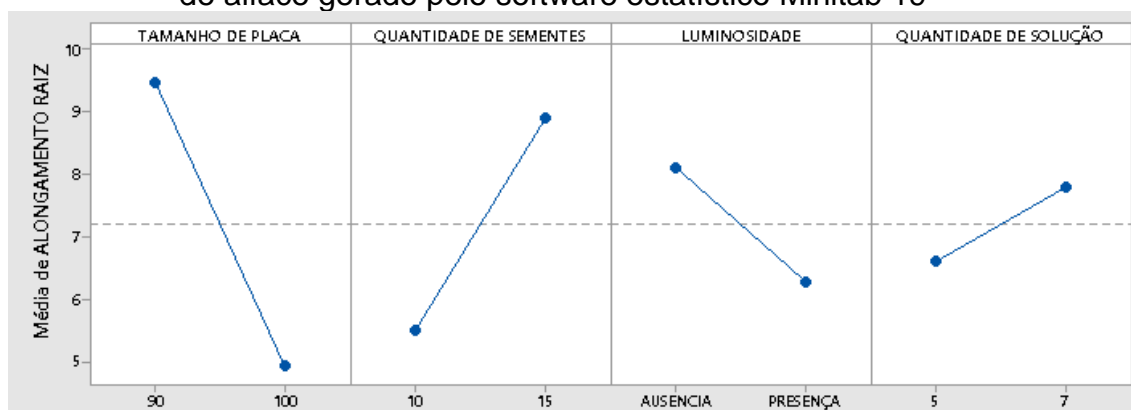
Nascimento e Cantliffe (2002) organizam as principais causas associadas a não germinação das sementes, sendo essas: redução da permeabilidade do tegumento a trocas gasosas, impermeabilidade do tegumento à água, acumulação de produtos metabólicos no endosperma e embrião, efeitos inibitórios do ácido abscísico, mau funcionamento do fitocromo, barreira física do tegumento e, ou endosperma e inibição da secreção de enzimas da parede celular. Dentre estes se destaca o fitocromo, que são moléculas receptoras que agem como sensor na percepção luminosa incidente e regulador na transferência de informação a outros componentes celulares (MARTÍNEZ-GARCÍA, J; et al., 2002).

### 5.3.2 Efeito no alongamento da raiz e parte aérea (hipocótilo)

A rizogênese é uma das etapas mais importante na formação e crescimento das plantas de alface, é nesta etapa onde são formadas as primeiras raízes responsáveis pela função de absorver água e nutrientes, sendo esta etapa regulada por auxinas que atuam no alongamento e divisão celular, mantendo o sistema em bom estado para o desenvolvimento correto das raízes (SILVA, 2019).

Na Figura 17 é possível observar como os máximos e mínimos de como cada uma das variáveis de controle atuaram na taxa no alongamento da raiz deste ensaio, nessa figura tamanho de placas e quantidade apresentam comportamentos menos acentuados como em 90milímetros em tamanho de placas e 15 sementes em relação à quantidade de sementes.

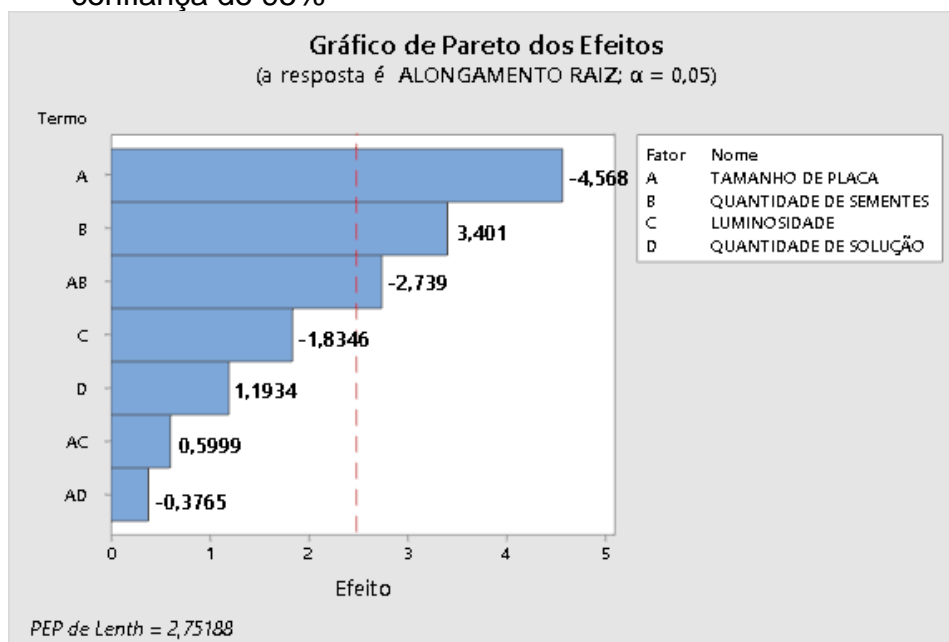
Figura 17. Máximos e mínimos dos valores observados (médias ajustadas) das variáveis de controle em sua atuação na germinação de sementes de alface gerado pelo software estatístico Minitab 19



Fonte: Autor, 2020.

A Figura 18 apresenta os efeitos principais e associação das variáveis de controle no crescimento da raiz das semente, esse efeito é expressado pelo gráfico de Pareto, onde foi traçada uma linha para destacar quais os principais fatores se sobressaíram em relação a outros a um nível de confiança de 95% ( $\alpha=0,05$ ), no qual se destacou o fator tamanho da placa apresentando um efeito de negativo de -4,568 indicando que este é o que menos contribui nesta variável de resposta e quantidade de semente como o fator que mais contribui com um efeito positivo de 3,401.

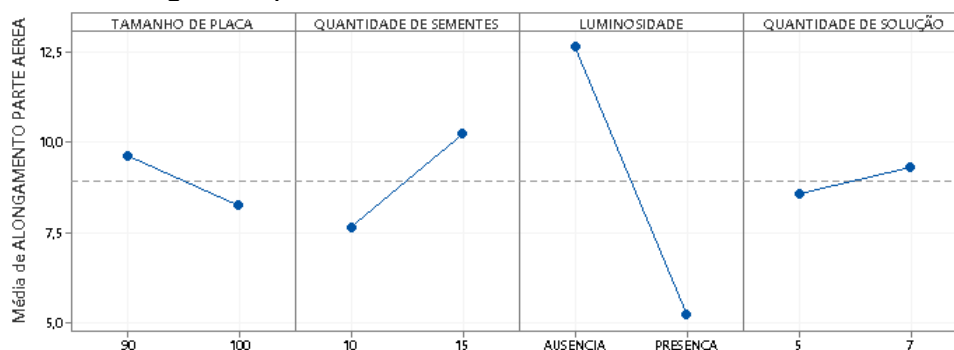
Figura 18. Gráfico de Pareto gerado pelo software estatístico *Minitab 19* para os efeitos no alongamento da raiz de sementes de alface a um nível de confiança de 95%



Fonte: Autor, 2020.

O alongamento do hipocótilo ou como chamado nessa análise, parte aérea das plântulas de alface medidos tem seus valores máximo e mínimos ajustados apresentados na Figura 19, a qual é perceptível que a presença da luminosidade age de forma radical na diminuição deste crescimento. As plântulas originárias de cultivares ou de sementes com alongamento de hipocótilo mais altas, apresentaram uma mais rápida germinação (COSTA, et al., 1999).

Figura 19. Máximos e mínimos dos valores observados (médias ajustadas) das variáveis de controle em sua atuação na germinação de sementes de alface gerado pelo software estatístico *Minitab 19*

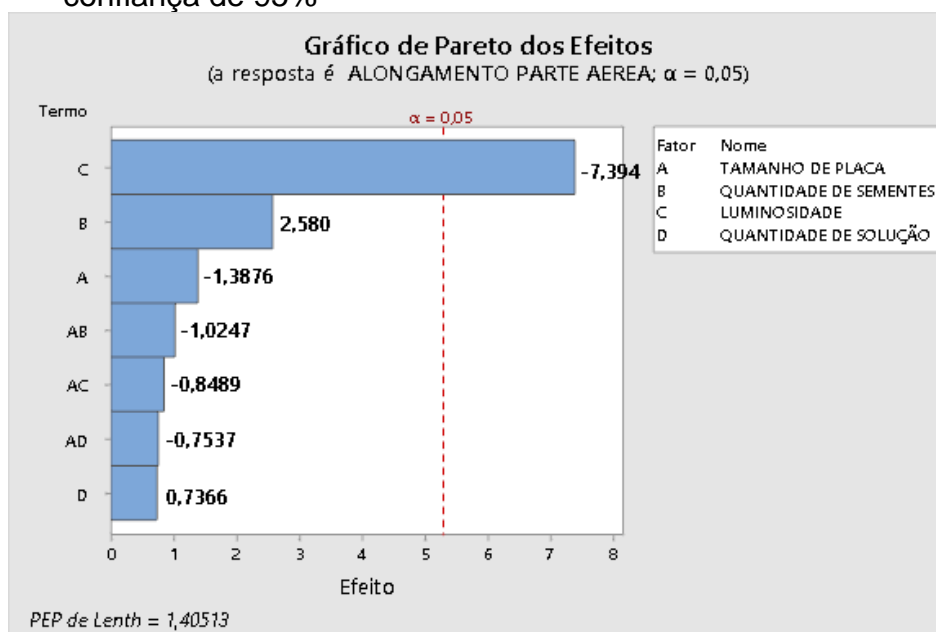


Fonte: Autor, 2020.

A Figura 20 apresenta os efeitos principais e associação das variáveis de controle no crescimento da parte aérea, esse efeito é expressado pelo gráfico de

Pareto, no qual foi traçada uma linha para destacar quais os principais fatores se sobressaíram em relação a outros a um nível de confiança de 95% ( $\alpha=0,05$ ), no qual se destacou o fator luminosidade apresentando um efeito de negativo de -7,394 indicando que este é o que menos contribui nesta variável de resposta e quantidade de semente como o fator que mais contribui com um efeito positivo de 2,580.

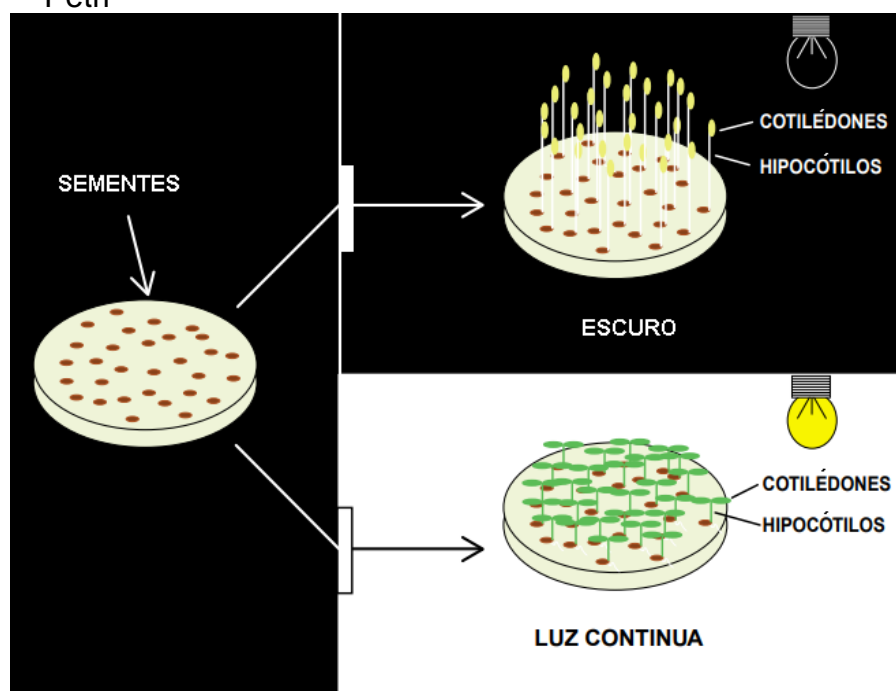
Figura 20. Gráfico de Pareto gerado pelo software estatístico *Minitab 19* para os principais efeitos na germinação de sementes de alface a um nível de confiança de 95%



Fonte: Autor, 2020.

Na Figura 21, adaptada de Martínez-García e colaboradores (2002), é destacado o efeito da presença de luz contínua em sementes de *Arabidopsis thaliana* uma planta herbácea, o efeito observado é explicado, pois as mudas que crescem no escuro não desenvolvem órgãos fotossintéticos, apresentando um aspecto amarelado esbranquiçado devido à ausência de clorofilas e concentram seus recursos no hipocótilo em busca de luz. Já nas mudas mantidas sob luminosidade constante há uma inibição do alongamento do hipocótilo, ocorrendo a expansão dos cotilédones e desenvolvendo aparato fotossintética para captação da luz.

Figura 21. Esquema da germinação e crescimento morfológico de sementes na ausência e presença de luminosidade para sementes em placa de Petri

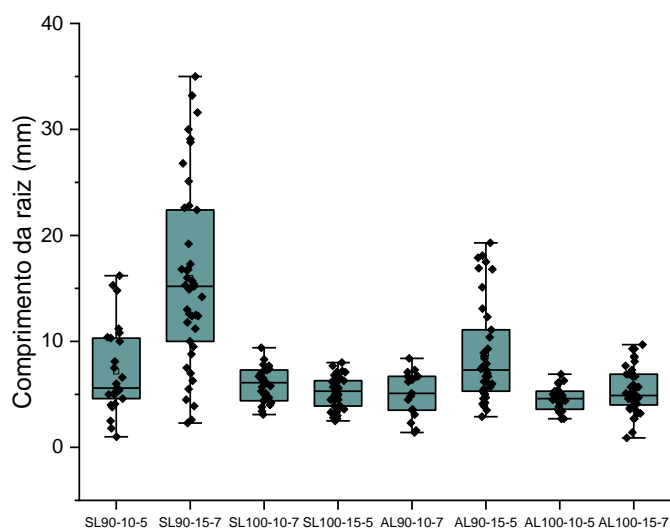


Fonte: adaptado de García, 2002.

### 5.3.3 Análise de variância (ANOVA) no ensaio padrão com *Lactuca sativa* L.

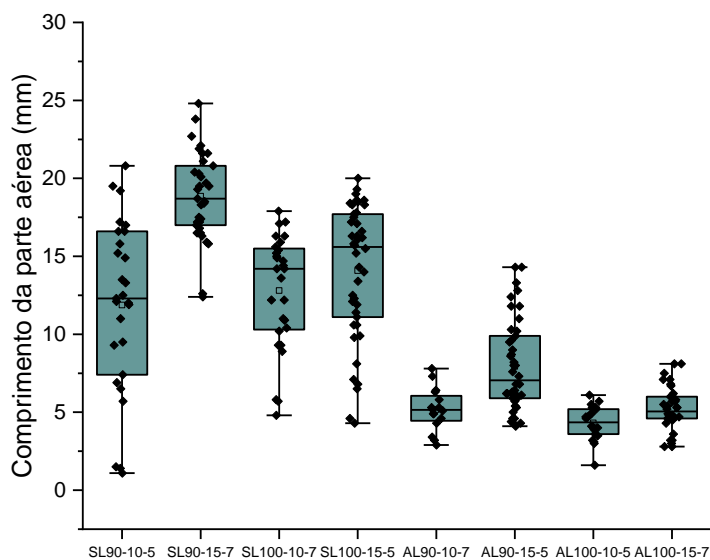
Segundo NETO e colaboradores (2017), a aplicação do bloxplot está inserida na análise exploratória de dados, esse estudo busca expor tendências e diversificar a apresentação de resultados em dados de uma pesquisa. O boxplot também é útil na detecção de Outliers, valores extremos ou também chamados de aberrantes, os quais podem ser causados por diferentes tipos de erros experimentais ou por variações biológicas. Deste modo, o boxplot foi utilizado nesse trabalho com a finalidade de remover possíveis valores anormais dentro da distribuição dos dados antes da análise de variância ser implementada, tendo a Figura 22 e 23 para o comprimento da raiz e parte aérea, respectivamente nas quais já foram previamente removidos os outliers com a ajuda da ferramenta gráfica e de análise de dados Originlab 2019.

Figura 22. Boxplots para os diferentes ensaios em uma análise da variável comprimento da raiz



Fonte: Autor, 2021.

Figura 23. Boxplots para os diferentes ensaios em uma análise da variável comprimento da parte aérea.



Fonte: Autor, 2021.

Com o objetivo de verificar se as diferenças entre as médias das variáveis de controle presente na Tabela 11, diferiam ou não significativamente, aplicou-

se o teste de hipótese denominado análise de variância (ANOVA). Segundo Paese (2001) apud Montgomery (1991), esta é uma ferramenta de comparação de vários grupos ou estratos de interesse. Utilizou-se na aplicação do teste de análise de variância um nível de significância igual a  $\alpha=0,05$ , o que representa uma confiabilidade de 95% nos resultados. Esta análise foi implementada no software estatístico Graphpad Prism 7, o qual testou a hipótese nula ( $H_0$ ) e alternativa ( $H_1$ ) que são:  $H_0$  – as médias dos ensaios para as diferentes variáveis são iguais e  $H_1$  – ao menos uma das médias dos ensaios é diferente das demais.

Tabela 11. Valores dos parâmetros de respostas coletados segundo experimento fatorial executado

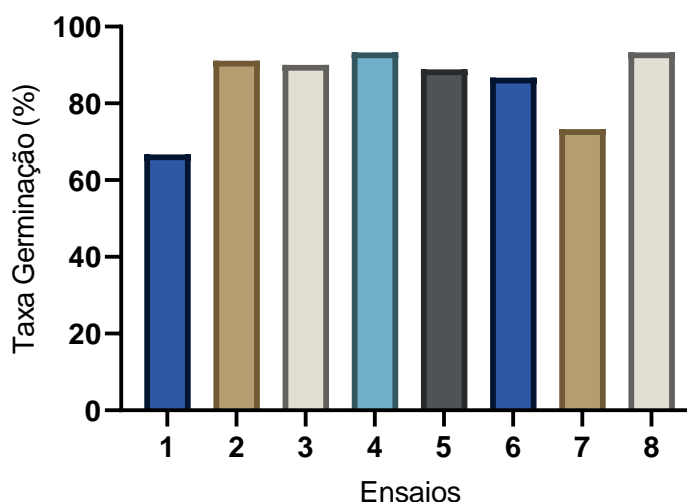
<b>Parâmetros</b>	<b>Ensaio 1</b>	<b>Ensaio 2</b>	<b>Ensaio 3</b>	<b>Ensaio 4</b>	<b>Ensaio 5</b>	<b>Ensaio 6</b>	<b>Ensaio 7</b>	<b>Ensaio 8</b>
<b>Germinação</b>	66,7	91,1	90	93,3	88,9	86,7	73,3	93,3
<b>Alongamento da raiz</b>	6,0	14,5	5,6	10,5	5,0	6,8	3,6	5,4
<b>Alongamento da parte aérea</b>	5,3	15,4	11,6	7,4	4,9	10,3	3,3	13,1

Fonte: Autor, 2020.

Assim, se o valor de F obtido pela equação de estatística de teste for maior que o valor de F crítico (tabelado), rejeita-se a hipótese nula, ou seja, pelo menos uma delas difere significativamente. Essa rejeição ou não desta hipótese pode ser verificada por meio do valor de P, se esse for menor ou igual a  $\alpha=0,05$ , rejeita-se a  $H_0$  e se for maior que alfa, não se rejeita a hipótese nula, em consequência pode se afirmar que não há diferença significativa (TIMOSSI et al., 2010).

A taxa de germinação das sementes da *Lactuca sativa* L. apresentada na Figura 24, mostra os ensaios 1 e 7 com taxas abaixo de 80%, sendo esses classificados pela USEPA como baixo em um ensaio realizado como um controle negativo, neste caso, água destilada.



Figura 24. Taxa de germinação das sementes da *Lactuca sativa* L. calculada

Fonte: Autor, 2020.

O resultado presente na Tabela 12, indicam que houve diferença significativa, uma vez, que o F calculado foi maior que o F crítico e tendo  $P < 0,001$ , logo se rejeita a hipótese nula. Portanto, há evidências que esses ensaios diferem.

Tabela 12. Parâmetros calculados pela ferramenta estatística GraphPad Prism 7 para a análise de variância a 95% de limite de confiança para os ensaios analisados para o comprimento das raízes das plântulas de alface

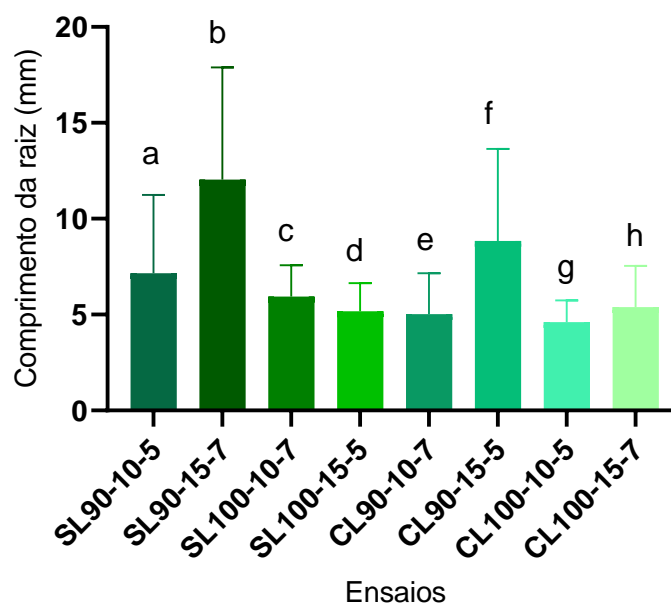
Tabela ANOVA	SQ	GL	QM	Estat. F	P-valor
Tratamento (entre colunas)	3722	7	531,7	F (7, 239) = 27,13	$P < 0,0001$
Resíduos (dentro de colunas)	4684	239	19,60		
Total	8405	246			

Fonte: Autor, 2020.

Onde: SQ= Soma dos Quadrados; GL= Grau de Liberdade; QM= Quadrados Médios

Na Figura 25 estão representadas as médias de cada um dos ensaios com suas respectivas incertezas associadas em forma de gráfico de barras gerado pelo Graphpad Prism 7, na qual é possível verificar como tais ensaios diferem.

Figura 25. Comprimento da raiz das plântulas de alface em diferentes ensaios em milímetros



Fonte: Autor, 2020.

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ )

O resultado presente na Tabela 13, indicam que houve diferença significativa, uma vez, que o F calculado foi maior que o F crítico e tendo  $P < 0,001$ , logo se rejeita a hipótese nula. Portanto, há evidências que esses ensaios diferem.

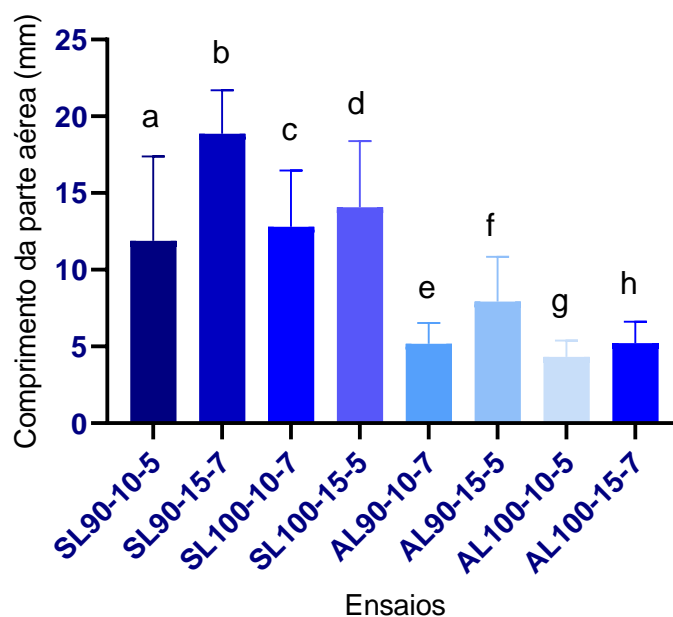
Tabela 13. Parâmetros calculados pela ferramenta estatística GraphPad Prism 7 para a análise de variância a 95% de limite de confiança para os ensaios analisados para o comprimento das partes aéreas das plântulas de alface

Tabela ANOVA	SQ	GL	QM	Estat. F	P-valor
Tratamento (entre colunas)	5616	7	802,3	F (7, 238) = 72,19	$P < 0,0001$
Resíduos (dentro de colunas)	2645	238	11,11		
Total	8261	245			

Fonte: Autor, 2020.

Onde: SQ= Soma dos Quadrados; GL= Grau de Liberdade; QM= Quadrados Médios

Figura 26. Comprimento da parte aérea das plântulas de alface em diferentes ensaios (mm)



Fonte: Autor, 2020.

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ )

Na Figura 26 estão representadas as médias de cada um dos ensaios com suas respectivas incertezas associadas em forma de gráfico de barras gerado pelo Graphpad Prism 7, na qual é possível verificar como tais ensaios diferem.

A análise de variância (ANOVA) auxilia assim como a análise feita através do estudo dos efeitos principais, mas nesta não é possível observar certas características referentes ao crescimento e sobrevivências das sementes de alface. Sendo assim, deu-se preferência para escolha de valores e atributos que ocasionaram um melhor desenvolvimento das sementes de alface, uma vez que este ocorreu tendo como efluente água destilada.

#### 5.4 Teste de Toxicidade dos corantes brutos com *Lactuca sativa* L.

As diretrizes desse ensaio seguem em consonância com os resultados obtidos conforme ensaio padrão do planejamento experimental ( $2^{4-1}$ ) com as variáveis selecionadas. O quadro 1 mostra de forma enumeradas as condições detalhadas deste teste.

Quadro 1. Condições para teste de germinação de sementes

1. Tipo de teste	Estatístico
2. Temperatura	25 °C
3. Luz	Ausente
4. Recipiente do teste	Placa de Petri (90mm) e Papel Filtro
5. Volume de teste	5
6. Número de sementes	15
7. Replicas	3
8. Controles	Água destilada / Sulfato de Zinco II (Zn <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )
9. Duração do teste	120 horas

Fonte: Autor, 2020.

##### 5.4.1 Corante Reativo Laranja 122

Para o corante reativo Laranja 122, levando em consideração o controle 1 (água destilada), o qual espera-se um melhor desenvolvimento dos três fatores de controle em uma análise de variância (ANOVA) utilizando o software estatístico GraphPad Prism 7, foi determinada que houve diferença significativa entre as concentrações utilizadas com o controle a um nível de confiança de 95% com parâmetros calculados apresentados na Tabela 14 e 15 para o alongamento da parte aérea e raiz, respectivamente.

Tabela 14. Parâmetros calculados pela ferramenta estatística GraphPad Prism 7 para a análise de variância a 95% de limite de confiança para o alongamento da parte aérea

ANOVA	SQ	GL	QM	Estat. F	P-valor
<b>Tratamento (entre colunas)</b>	340,9	6	56,81	F (6, 273) = 1,217	P=0,297 6
<b>Resíduo (dentro das colunas)</b>	12744	273	46,68		
<b>Total</b>	13085	279			

Onde: SQ= Soma dos Quadrados; GL= Grau de Liberdade; QM= Quadrados Médios  
Fonte: Autor, 2020.

Tabela 15. Parâmetros calculados pela ferramenta estatística GraphPad Prism 7 para a análise de variância a 95% de limite de confiança para o alongamento da raiz

ANOVA	SQ	GL	QM	Estat. F	P-valor
<b>Tratamento (entre colunas)</b>	3289	7	469,8	F (7, 338) = 23,28	P<0,0001
<b>Resíduo (dentro das colunas)</b>	6821	338	20,18		
<b>Total</b>	10110	345			

Onde: SQ= Soma dos Quadrados; GL= Grau de Liberdade; QM= Quadrados Médios  
Fonte: Autor, 2020.

O teste de F indicou que para o alongamento da parte aérea não houve diferença significativa entre nenhuma das concentrações em relação ao controle 1, como pode ser visto na Tabela 14. O teste de Dunnett se faz necessários caso algum desses tratamentos defiram do controle e este teste está calculado na Tabela 16. Sendo esse efeito também perceptível através do gráfico de barras das médias com suas incertezas associadas apresentadas pela Figura 27.

Tabela 16. Análise dos dados de alongamento da parte aérea (mm) da alface usando o teste de Dunnett para as diferentes concentrações do corante

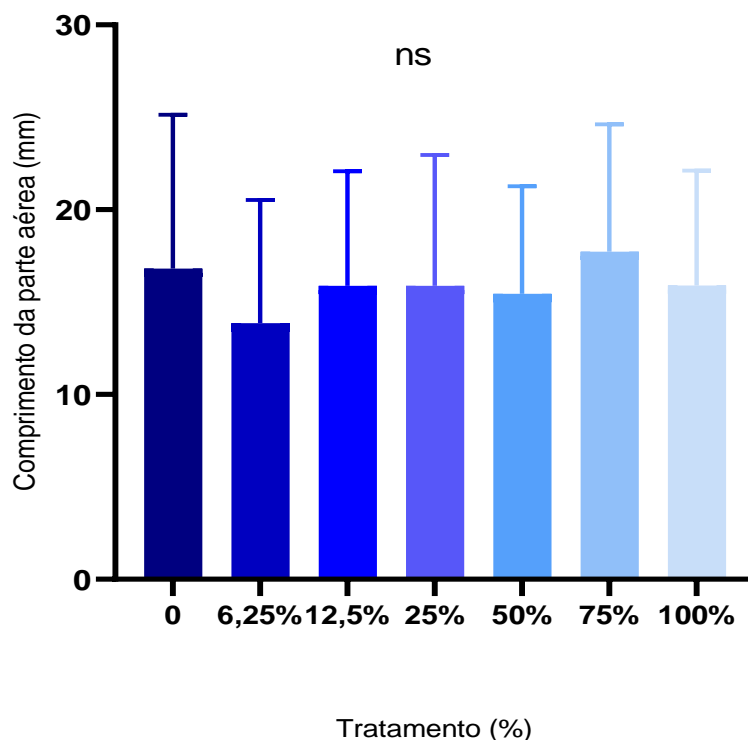
Teste de Dunnett	Diferença média	Intervalor de confiança (95 %)	Significância	Valor P ajustado
Controle 1 vs. 100%	2,966	-0,9928 to 6,925	ns	0,2225
Controle 1 vs. 75%	0,9361	-2,946 to 4,818	ns	0,9764
Controle 1 vs. 50%	0,9396	-2,875 to 4,754	ns	0,9738
Controle 1 vs. 25%	1,373	-2,896 to 5,642	ns	0,9141
Controle 1 vs. 12,5%	-0,8995	-4,736 to 2,937	ns	0,9794
Controle 1 vs. 6,25%	0,9238	-2,912 to 4,760	ns	0,9765

Fonte: Autor, 2020.

ns = Não Significativo

\* = Pouco Significativo

Figura 27. Crescimento da parte aérea das plântulas de alface em diferentes controles e diferentes concentrações do corante reativo laranja 122



Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, de acordo com o teste de Dunnett ( $p \leq 0,05$ )  
 Fonte: Autor, 2020.

Já o teste F para o alongamento da raiz indicou que houve diferença significativa entre um ou mais tratamentos em relação ao controle 1, como pode ser visto na Tabela 15. A partir do teste de Dunnett é possível concluir quais grupos diferiram entre o controle, assim como apresentado na tabela 17. Esse efeito perceptível pela Figura 28, onde tem-se quase todas as concentrações apresentam média menor que o controle, exceto 75%. Indica-se assim, que este corante apresenta um possível efeito tóxico inibitório com parâmetro mais sensível o alongamento da raiz.

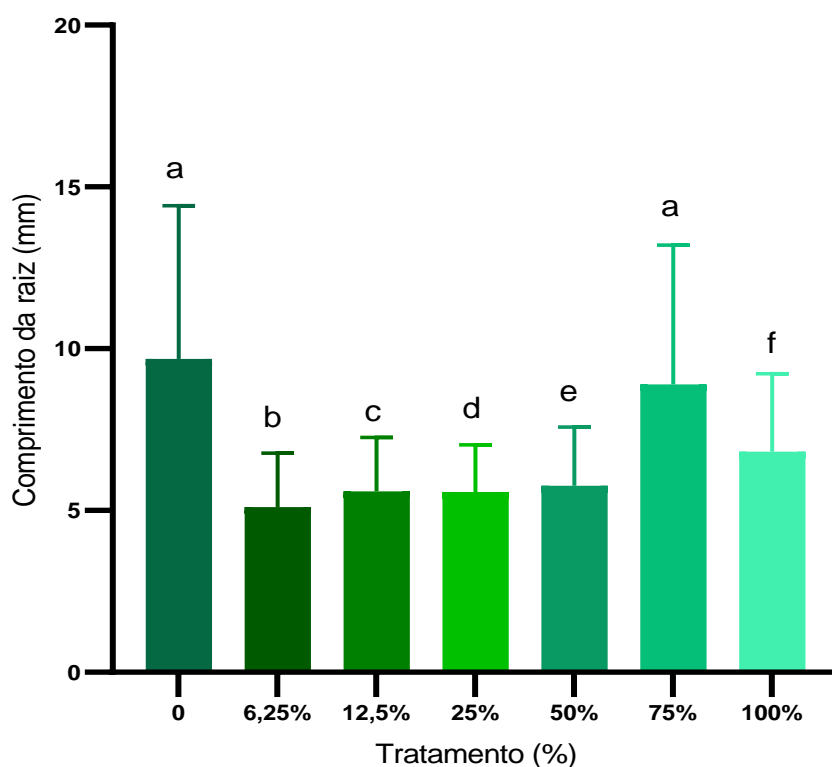
Tabela 17. Análise dos dados de alongamento da raiz (mm) da alface usando o teste de Dunnett para as diferentes concentrações do corante

Teste de Dunnett	Diferença média	Intervalo de confiança (95 %)	Significância	Valor P ajustado
Controle 1 vs. 6,25%	4,585	2,815 to 6,354	****	<0,0001
Controle 1 vs. 12,5%	4,093	2,343 to 5,842	****	<0,0001
Controle 1 vs. 25%	4,111	2,342 to 5,881	****	<0,0001
Controle 1 vs. 50%	3,921	1,994 to 5,848	****	<0,0001
Controle 1 vs. 75%	0,7875	-0,9344 to 2,509	ns	0,6838
Controle 1 vs. 100%	2,871	1,149 to 4,593	***	0,0002

Fonte: Autor, 2020.

\*\*\*\* = Muito Significativo

Figura 28. Alongamento da raiz das plântulas de alface em diferentes controles e diferentes concentrações do corante reativo laranja 122



Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, de acordo com o teste de Dunnett ( $p \leq 0,05$ )

Fonte: Autor, 2020.

Na figura 28 pode-se observar que quase todas as concentrações do corante reativo laranja 122 apresentaram diferenças significativas quando comparado a amostra da água, interferindo assim no alongamento da raiz da alface.

#### 5.4.2 Corante Reativo Amarelo 2R

Para o amarelo 2R levando em consideração o controle 1 (água destilada), o qual espera-se um melhor desenvolvimento dos três fatores de controle em uma análise de variância (ANOVA) utilizando o software estatístico GraphPad Prism 7, foi determinada que não houve diferença significativa entre as concentrações utilizadas e controle 1 a um nível de confiança de 95% para as medidas do crescimento da parte aérea com parâmetros calculados apresentados na Tabela 18. Já para o alongamento da raiz a ANOVA concluiu que houve diferença entre todas as concentrações utilizadas com parâmetros calculados apresentados na Tabela 19.

Tabela 18. Parâmetros calculados pela ferramenta estatística GraphPad Prism 7 para a análise de variância a 95% de limite de confiança para o alongamento da parte aérea

ANOVA	SQ	GL	QM	Estat. F	P-valor
<b>Tratamento (entre colunas)</b>	402,8	6	67,13	F (6, 308) = 1,08	P=0,3740
<b>Resíduo (dentro das colunas)</b>	19135	308	62,13		
<b>Total</b>	19538	314			

Onde: SQ= Soma dos Quadrados; GL= Grau de Liberdade; QM= Quadrados Médios  
Fonte: Autor, 2020.

Tabela 19. Parâmetros calculados pela ferramenta estatística GraphPad Prism 7 para a análise de variância a 95% de limite de confiança para o alongamento da raiz

ANOVA	SQ	GL	QM	Estat. F	P-valor
<b>Tratamento (entre colunas)</b>	5193	7	741,9	F (7, 352) = 26,77	P<0,0001
<b>Resíduo (dentro das colunas)</b>	9755	352	27,71		
<b>Total</b>	14948	359			

Onde: SQ= Soma dos Quadrados; GL= Grau de Liberdade; QM= Quadrados Médios  
Fonte: Autor, 2020.



O teste de Dunnett para o alongamento da parte aérea não apresentou diferença significativa em nenhuma das concentrações analisadas em relação ao controle 1, como pode ser visto na Tabela 20. Essa conclusão pode ser tida de uma forma mais visual pela Figura 29, onde as concentrações apresentam um crescimento muito próximo ao controle 1. Já o mesmo teste para o alongamento da raiz apresentou diferença significativa em todas as concentrações em relação ao controle 1, como pode ser visto na Tabela 21. Esse efeito perceptível pela Figura 30, onde tem-se todas as concentrações apresentam médio menor que o controle. Esta análise aponta um possível efeito tóxico inibitório no parâmetro alongamento da raiz.

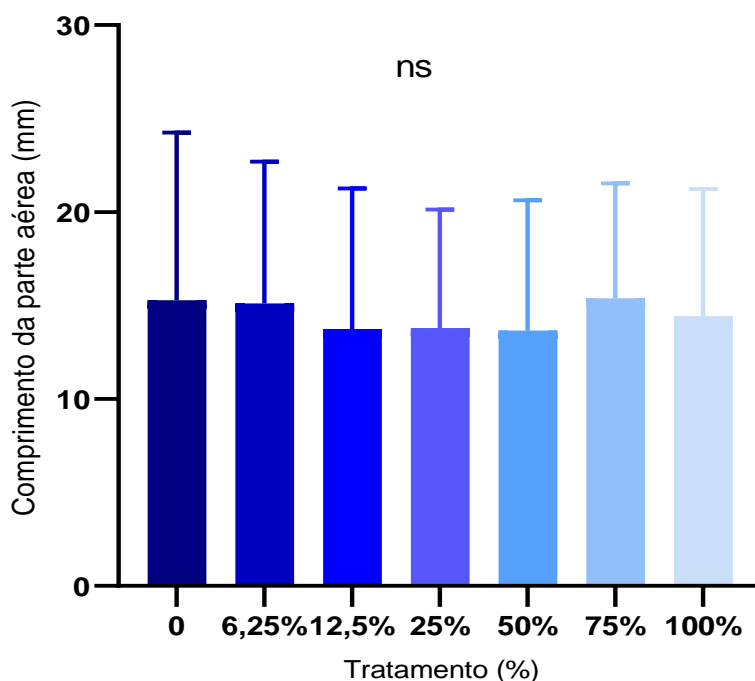
Tabela 20. Análise dos dados de alongamento da parte aérea (mm) da alface usando o teste de Dunnett para as diferentes concentrações do corante

<b>Teste de Dunnett</b>	<b>Diferença média</b>	<b>Intervalo de confiança (95 %)</b>	<b>Significância</b>	<b>Valor P ajustado</b>
Controle 1 vs. 100%	1,92	-2,166 to 6,006	ns	0,7026
Controle 1 vs. 75%	1,349	-2,737 to 5,435	ns	0,9226
Controle 1 vs. 50%	3,856	-0,2304 to 7,942	ns	0,0732
Controle 1 vs. 25%	2,216	-1,87 to 6,302	ns	0,5610
Controle 1 vs. 12,5%	2,873	-1,213 to 6,959	ns	0,2874
Controle 1 vs. 6,25%	2,602	-1,484 to 6,688	ns	0,3885

Fonte: Autor, 2020.

ns = Não Significativo

Figura 29. Crescimento da parte aérea das plântulas de alface em diferentes controles e diferentes concentrações do corante reativo amarelo 2R



ns= não significativo  
Fonte: Autor, 2020.

A figura 30 indica que nenhuma concentração do corante amarelo 2R quando comparado ao controle, constituído apenas de água destilada, interferiu no crescimento do hipocótilo da *L. sativa*.

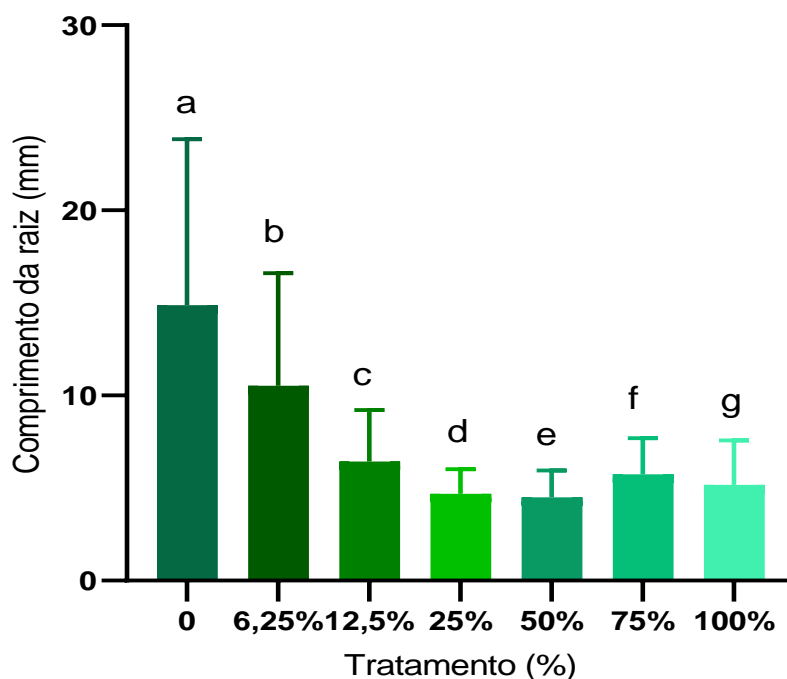
Tabela 21. Análise dos dados de alongamento da raiz (mm) da alface usando o teste de Dunnett para as diferentes concentrações do corante

Teste de Dunnett	Diferença média	Intervalo de confiança (95 %)	Significância	Valor P ajustado
Controle 1 vs. 100%	10,2	7,283 to 13,11	****	0,0001
Controle 1 vs. 75%	10,04	7,128 to 12,96	****	0,0001
Controle 1 vs. 50%	10,37	7,459 to 13,29	****	0,0001
Controle 1 vs. 25%	10,81	7,897 to 13,73	****	0,0001
Controle 1 vs. 12,5%	8,809	5,894 to 11,72	****	0,0001
Controle 1 vs. 6,25%	5,709	2,794 to 8,623	****	0,0001

Fonte: Autor, 2020.

\*\*\*\* = Muito Significativo

Figura 30. Alongamento da raiz das plântulas de alface em diferentes controles e diferentes concentrações do corante reativo amarelo 2R



Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, de acordo com o teste de Dunnett ( $p \leq 0,05$ )

Fonte: Autor, 2020.

Analisando a figura acima pode-se observar que houve diferença estatística nas diferentes concentrações do corante amarelo 2R quando foram confrontadas com a amostra de água destilada. A amostra do corante de menor concentração, apresentou maior desenvolvimento da parte aérea da planta.

#### 5.4.3 Corante Reativo Vermelho 35/5B

Para o vermelho 5B levando em consideração o controle 1 (água destilada), o qual espera-se um melhor desenvolvimento dos três fatores de resposta em uma análise de variância (ANOVA) utilizando o software estatístico GraphPad Prism 7, foi determinada que não houve diferença significativa entre as concentrações utilizadas e o controle 1 a um nível de confiança de 95% para o alongamento da parte aérea com parâmetros calculados apresentados na Tabela 22. Para o alongamento da raiz pela ANOVA ficou determinado que houve diferença significativa com parâmetros calculados apresentados na Tabela 23.

Tabela 22. Parâmetros calculados pela ferramenta estatística GraphPad Prism 7 para a análise de variância a 95% de limite de confiança para o alongamento da parte aérea

<b>ANOVA</b>	<b>SQ</b>	<b>GL</b>	<b>QM</b>	<b>Estat. F</b>	<b>P-valor</b>
<b>Tratamento (entre colunas)</b>	108,2	6	18,03	F (6, 308) = 0,2827	P=0,9449
<b>Resíduo (dentro das colunas)</b>	19643	308	63,78		
<b>Total</b>	19751	314			

Onde: SQ= Soma dos Quadrados; GL= Grau de Liberdade; QM= Quadrados Médios

Fonte: Autor, 2020.

Tabela 23. Parâmetros calculados pela ferramenta estatística GraphPad Prism 7 para a análise de variância a 95% de limite de confiança para o alongamento da raiz

<b>ANOVA</b>	<b>SQ</b>	<b>GL</b>	<b>QM</b>	<b>Estat. F</b>	<b>P-valor</b>
<b>Tratamento (entre colunas)</b>	4496	7	642,3	F (7, 352) = 13,96	P<0,0001
<b>Resíduo (dentro das colunas)</b>	16192	352	46		
<b>Total</b>	20688	359			

Onde: SQ= Soma dos Quadrados; GL= Grau de Liberdade; QM= Quadrados Médios

Fonte: Autor, 2020.

O teste de Dunnett para o alongamento da parte aérea não apresentou diferença significativa em nenhuma das concentrações em relação ao controle 1, como pode ser visto na Tabela 24. Esse efeito é perceptível pela Figura 31, onde as concentrações apresentaram crescimento médio muito próximos ao controle 1. Já o mesmo teste para o alongamento da raiz apresentou diferença significativa nas concentrações 100%, 12,5% e 6,25% em relação ao controle 1, como pode ser visto na Tabela 25, sendo esse efeito perceptível pela Figura 32. Esta análise aponta um possível efeito tóxico inibitório no parâmetro alongamento da raiz.

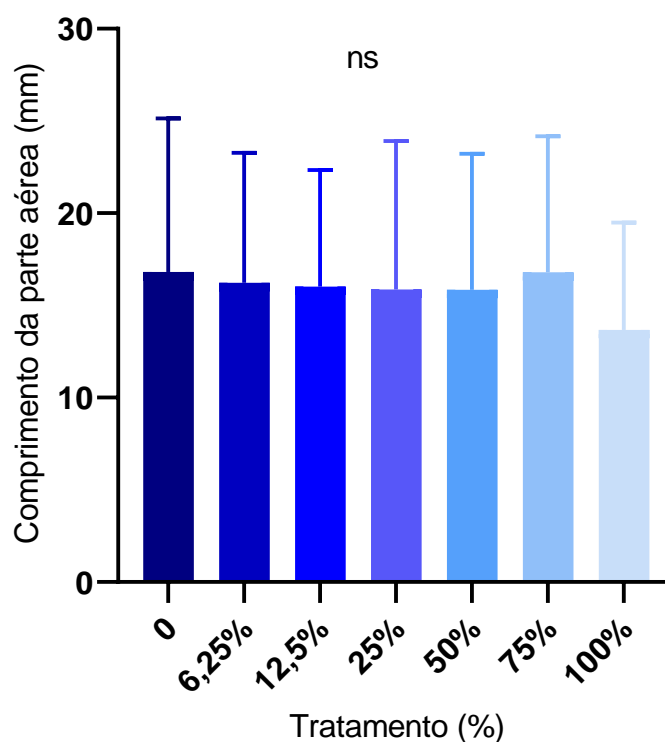
Tabela 24. Análise dos dados de alongamento da parte aérea (mm) da alface usando o teste de Dunnett para as diferentes concentrações do corante

Teste de Dunnett	Diferença média	Intervalo de confiança (95 %)	Significância	Valor P ajustado
Controle 1 vs. 100%	1,411	-2,729 to 5,551	ns	0,9107
Controle 1 vs. 75%	0,03111	-4,109 to 4,171	ns	0,9999
Controle 1 vs. 50%	-0,1422	-4,282 to 3,997	ns	0,9999
Controle 1 vs. 25%	0,5422	-3,597 to 4,682	ns	0,9995
Controle 1 vs. 12,5%	-0,3244	-4,464 to 3,815	ns	0,9997
Controle 1 vs. 6,25%	0,9156	-3,224 to 5,055	ns	0,9907

Fonte: Autor, 2020.

ns = Não Significativo

Figura 31. Crescimento da parte aérea das plântulas de alface em diferentes controles e diferentes concentrações do corante reativo vermelho 5B



ns= não significativo

Fonte: Autor, 2020.

Tabela 25. Análise dos dados de alongamento da raiz (mm) da alface usando o teste de Dunnett para as diferentes concentrações do corante

Teste de Dunnett	Diferença média	Intervalo de confiança (95 %)	Significância	Valor P ajustado
Controle 1 vs. 100%	1,662	-2,067 to 5,391	ns	0,7197
Controle 1 vs. 75%	5,333	1,669 to 8,997	**	0,0012
Controle 1 vs. 50%	2,198	-1,509 to 5,904	ns	0,4453
Controle 1 vs. 25%	2,102	-1,542 to 5,746	ns	0,4736
Controle 1 vs. 12,5%	2,181	-1,572 to 5,934	ns	0,4658
Controle 1 vs. 6,25%	4,021	0,3148 to 7,728	*	0,0275

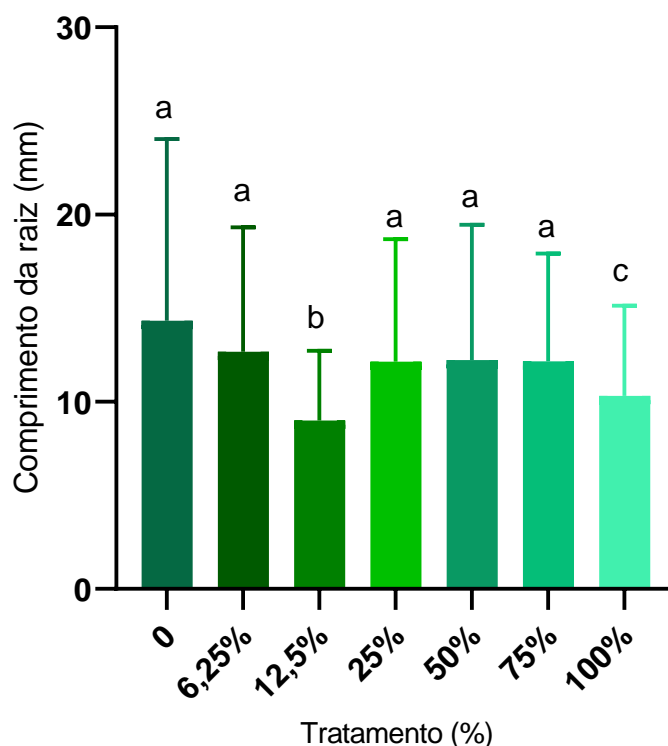
Fonte: Autor, 2020.

ns = Não Significativo

\* = Pouco Significativo

\*\* = Significativo

Figura 32. Alongamento da raiz das plântulas de alface em diferentes controles e diferentes concentrações do corante reativo vermelho 5B



Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, de acordo com o teste de Dunnett ( $p \leq 0,05$ )

Fonte: Autor, 2020.

O estudo tóxicológico foi feito de acordo com a análise de variância, mas também este poderia ser calculado de acordo com seus índices de germinação (IG), índice de inibição de alongamento da raiz (IR) e hipocótilo (IH). Autores

como Pérez et al. (2012) e Bagur-González, et al. (2010), utilizam deste parâmetro como indicadores de toxicidade. Este cálculo pode ser realizado conforme equação 18, classificando como tóxicas amostras com menos que 75% de germinação, no IR e IH se negativo tóxicas, positivas considera-se que houve estímulo. Na Tabela 26 estão presentes os valores coletados e utilizados para cálculos dos índices que constam na Tabela 27 para cada uma das amostras dos azocorantes utilizados.

$$\text{Índice (germinação, radícula, hipocólito)}\% = \frac{\text{Amostra-Controle}}{\text{Controle}} \times 100 \quad \text{Equação 18}$$

Tabela 26. Valores coletados para os ensaios com alface dos três azocorantes

[ ] (%)	Laranja			Amarelo			Vermelho		
	G%	RA	PA	G%	RA	PA	G%	RA	PA
100	95,6	6,5	15,2	91,1	5,5	13,8	95,6	10,5	14,3
75	95,6	8,5	16,9	93,3	5,7	14,4	93,3	12,1	15,7
50	96,7	5,9	16,9	86,7	5,3	11,8	100%	12,2	15,8
25	97,8	6,2	15,5	97,8	4,9	13,5	95,6	12,1	15,2
12,5	91,1	5,3	14,5	93,3	6,9	12,8	100%	9,3	16,0
6,25	84,4	4,3	11,7	86,7	10,0	13,1	91,1	11,5	14,8

Fonte: Autor, 2020.

Tabela 27. Índices de toxicidades para o bioensaio com alface

[ ]	Laranja			Amarelo			Vermelho		
	IG	IR	IH	IG	IR	IH	IG	IR	IH
<b>100</b>	0,02	-0,51	-0,03	-0,02	-0,59	-0,10	0,02	-0,21	-0,10
<b>75</b>	0,02	-0,36	0,08	0	-0,58	-0,10	0	-0,09	-0,002
<b>50</b>	0,04	-0,56	0,08	-0,07	-0,60	-0,25	0,07	-0,09	0,009
<b>25</b>	0,05	-0,53	-0,01	0,05	-0,63	-0,14	0,02	-0,09	-0,03
<b>12,5</b>	-0,02	-0,61	-0,08	0	-0,48	-0,18	0,07	-0,31	0,02
<b>6,25</b>	-0,09	-0,68	-0,26	-0,07	-0,25	-0,16	-0,02	-0,14	-0,06

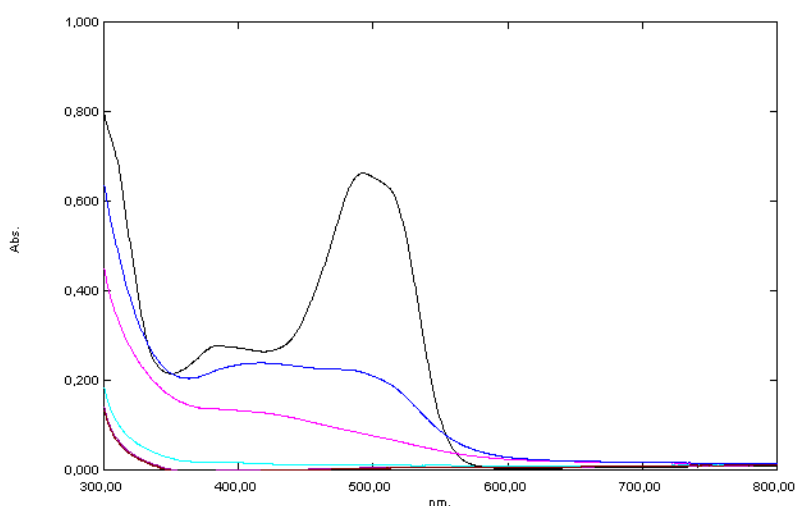
Fonte: Autor, 2020.

Essa avaliação demonstrou que nos três corante houve um efeito inibitório principalmente no parâmetro referente ao crescimento da raiz, com valores de inibição entre -0,09 a -0,68, assim como observado pela análise de variância (ANOVA).

### 5.5 Estudo de degradação dos azocorantes

Trabalhando-se em condições otimizadas previamente por (Neamtu et. al., 2003), foram realizados estudos da degradação dos corantes abordados, obtendo-se os resultados apresentados nas Figuras 33, 34 e 35. Nesta sequência de espectros é possível observar a rápida degradação do grupamento, o que permitiu a completa remoção de cor para o Laranja 122 em 30 minutos, o Amarelo 2R em 10 minutos e o Vermelho 5B/35 em 30 minutos pela utilização do reagente de Fenton com ação de radiação ultravioleta (Foto-Fenton).

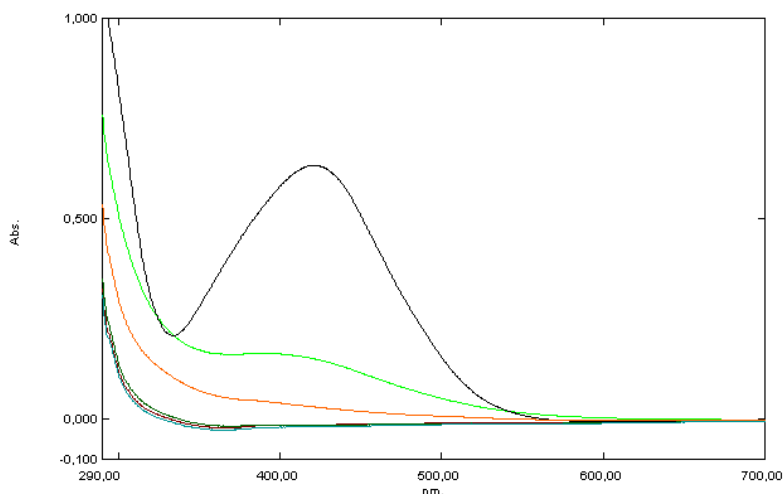
Figura 33. Monitoramento espectrofotométrico da degradação do corante reativo laranja 122 (corante: 50 mg/L, pH: 3, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 50 mg/L, peróxido de ferro II: 5 mg/L).



Fonte: Autor, 2020.

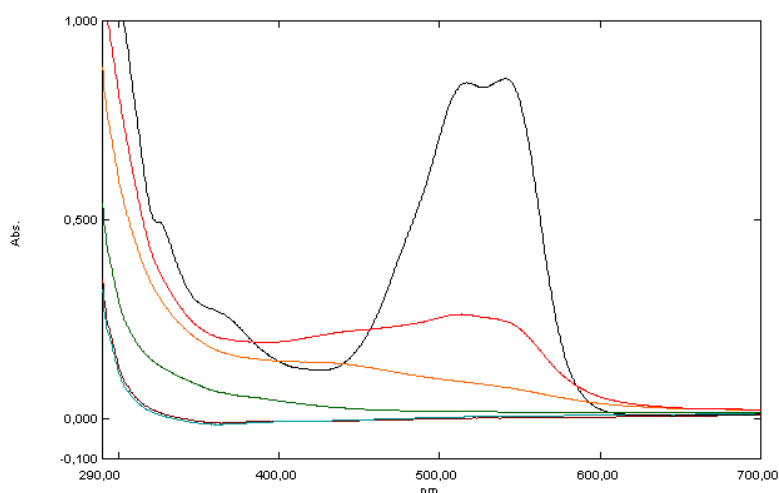


Figura 34. Monitoramento espectroscópico da degradação do corante reativo amarelo 2 (corante: 50 mg/L, pH: 3, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 50 mg/L, peróxido de ferro II: 5 mg/L)



Fonte: Autor, 2020.

Figura 35. Monitoramento espectroscópico da degradação do corante reativo vermelho (corante: 50 mg/L, pH: 3, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 50 mg/L, peróxido de ferro II: 5 mg/L)

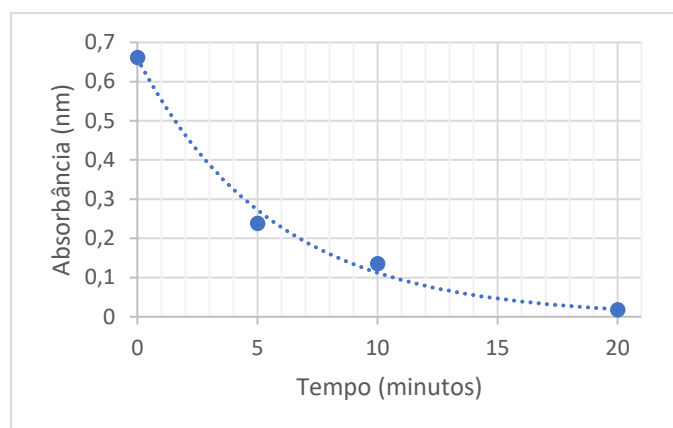


Fonte: Autor, 2020.

Conforme é observado nos tratamentos executados com os diferentes corantes, estes ocorreram em velocidade diferentes, tornando-se, portanto, interessante investigar a cinética dessas reações. As Figuras 36, 37 e 38 descrevem um comportamento decrescente da concentração do Laranja 122, Amarelo 2R e Vermelho 5B em função do tempo. A primeira etapa desta reação é iniciada pelos radicais hidroxila provenientes da reação entre o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e com os íons de Fe<sup>2+</sup> vindo do FeSO<sub>4</sub>. Essa etapa ocorre em alta velocidade e o peróxido de hidrogênio é consumido intensamente, devido a

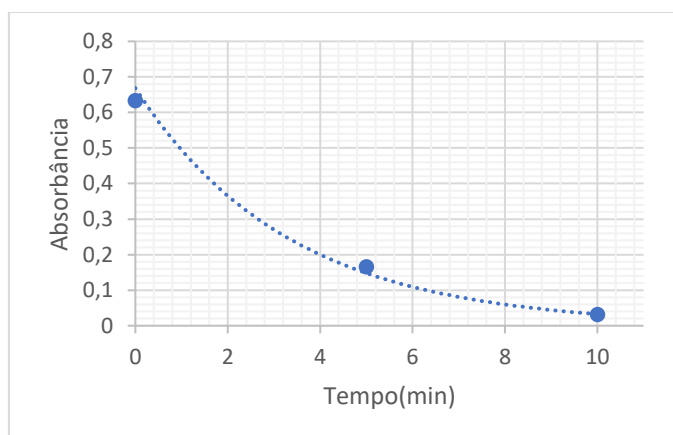
formação de seus radicais pela clivagem homolítica de sua molécula. A regeneração do  $\text{Fe}^{2+}$  nesta reação é crucial para toda a mineralização do poluente, mas essa reação dar-se de forma lenta, uma vez que a baixa concentrações de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em solução para reagir com  $\text{Fe}^{3+}$ .

Figura 36. Cinética reacional para degradação do azocorante reativo laranja 122 pelo processo Foto-Fenton.



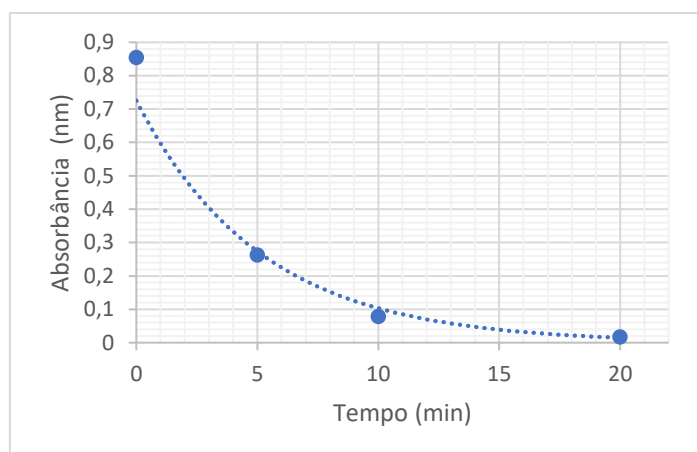
Fonte: Autor, 2020.

Figura 37. Cinética reacional para degradação do azocorante reativo amarelo 2R pelo processo Foto-Fenton



Fonte: Autor, 2020.

Figura 38. Cinética reacional para degradação do azocorante reativo vermelho 5B pelo processo Foto-Fenton



Fonte:Autor, 2020.

Uma reação de primeira ordem é aquela na qual a velocidade depende da concentração de somente uma espécie reativa elevado a primeira potência (BROWN, 2004). Neste caso a reação é dada por  $A \rightarrow \text{produtos}$ , com sua equação de velocidade descrita para a degradação dos corantes como:

$$Velocidade = \frac{\Delta[Corante]}{\Delta t} = k[Corante] \quad \text{Equação 19}$$

A partir de operações matemática de integração, esta relação é transformada em uma equação que relaciona a concentração inicial  $[Corante]_o$ , com sua concentração em qualquer tempo(t),  $[Corante]_t$ . Assim temos que:

$$\ln[Corante]_t - \ln[Corante]_o = -kt \quad \text{ou} \quad \ln \frac{[Corante]_t}{[Corante]_o} = -kt \quad \text{Equação 20}$$

$$\text{ou} \quad \ln[Corante]_t = -kt + \ln[Corante]_o$$

Estas equações podem ser utilizadas de várias formas como por exemplo determinar a concentração restante de uma espécie em qualquer momento após iniciada a reação, o tempo necessário para que uma fração da amostra reaja, o tempo necessário para que a concentração de uma espécie decresça até determinado nível.

A Equação 20 permite verifica se uma reação é de primeira ordem e determina sua constante de velocidade. Essa equação tem mesma forma de uma equação genérica de uma reta ( $y = ax+b$ ), onde a é a inclinação e b a intersecção da linha com o eixo y.

A reação de segunda ordem é aquela na qual a velocidade depende da concentração de uma espécie reativa elevada a segunda potência ou da concentração de duas espécies reativas distintas, com cada uma elevada a primeira potência. (BROWN et al.,2004). Tendo sua equação de velocidade descrita como:

$$Velocidade = \frac{\Delta[corante]}{\Delta t} = k[Corante]^2 \quad \text{Equação 21}$$

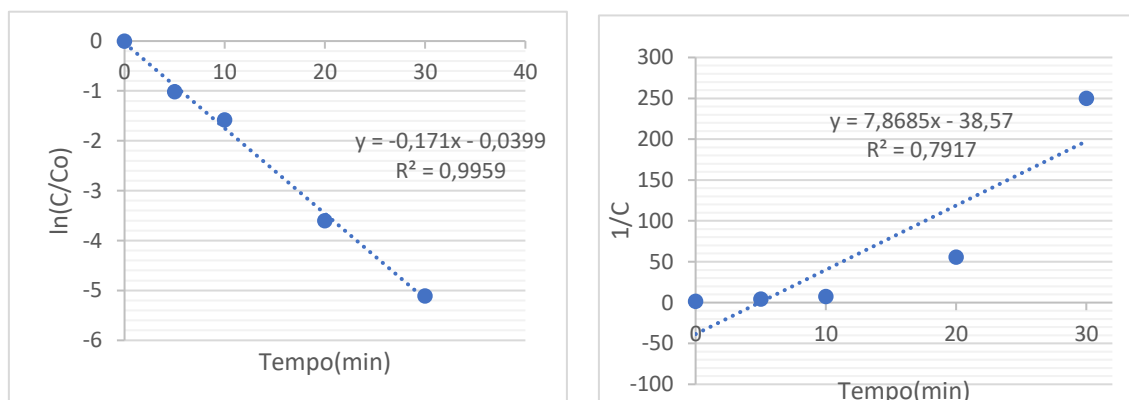
Aplicando operações matemáticas a Equação 21 permite a dedução da seguinte equação:

$$\frac{1}{[Corante]t} = kt + \frac{1}{[Corante]_0} \quad \text{Equação 22}$$

Essa equação assim como a 20, também tem a mesma forma de uma linha reta ( $y= ax+b$ ), deste modo, se uma reação for de segunda ordem apresentará um gráfico de  $1/[Corante]t$  em função de  $t$  como uma linha reta com uma inclinação igual a  $k$  e intercepto igual a  $1/[Corante]_0$ .

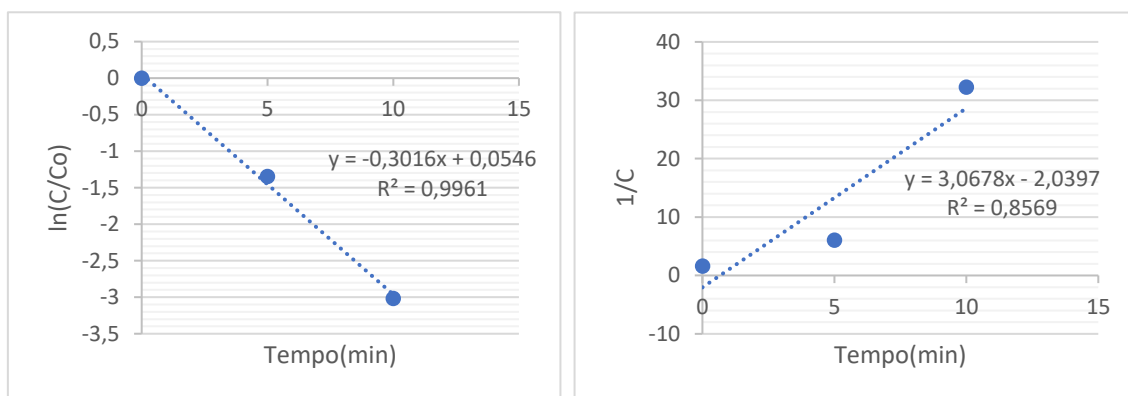
Para confirmar de fato que a cinética do processo é de 1ª ordem ou 2ª ordem, foi necessário eliminar a hipótese que obtivesse menor coeficiente de correlação linear ( $R^2$ ), observados pelas plotagens dos gráficos de  $\ln(C/C_0)$  em função do tempo( $t$ ), onde  $C$  é a concentração medida e  $C_0$  é a concentração no tempo zero para uma cinética de primeira ordem e para segunda ordem os gráficos de  $1/C$  em função do tempo ( $t$ ). Essa plotagem estão presentes nas Figura 39, 40 e 41.

Figura 39. Cinética de reação de 1ª e 2ª Ordem construído pela ferramenta Excel para o azocorante Laranja 122



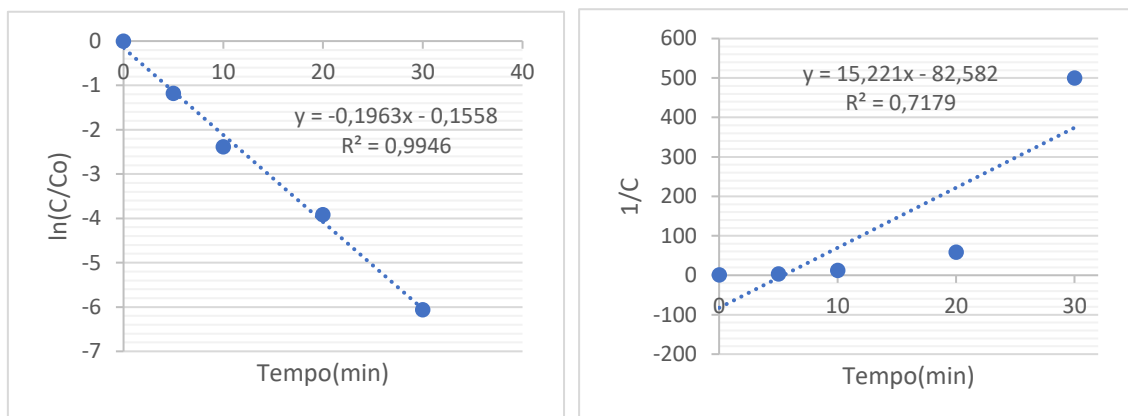
Fonte:Autor, 2020.

Figura 40. Cinética de reação de 1ª e 2ª Ordem construído pela ferramenta Excel para o azocorante Amarelo 2R



Fonte:Autor, 2020.

Figura 41. Cinética de reação de 1ª e 2ª Ordem construído pela ferramenta Excel para o azocorante Vermelho 5B



Fonte:Autor, 2020.

A partir desta avaliação pode afirmar que o comportamento cinético seguidos pelas reações de degradação desses corantes é de primeira ordem. Analisando os valores de constantes de velocidade obtidos, evidencia-se que a mineralização dos corantes Laranja e Vermelho ocorrem em uma taxa de reação um pouco menor que a reação de degradação do Amarelo, com ambos apresentando alta correlação linear ( $R^2$ ) dos dados com o modelo cinético de primeira ordem. A remoção de coloração (redução de valores de absorbância) foi calculada e estes valores, assim como as condições e tempo de meia vida calculada para cada reação estão presentes na Tabela 28.

Tabela 28. Descoloração (%) e constantes cinéticas segundo modelo linear para a oxidação avançada dos efluentes aquosos sintéticos (Laranja 122, Amarelo 2R e Vermelho 5B) e têxtil (T = 30 °C)

<b>Ensaio</b>	<b>azocorante</b>	<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (mg/L)</b>	<b>FeSO<sub>4</sub> (mg/L)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Remoção da coloração (%)</b>	<b>k (min<sup>-1</sup>)</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>Tempo de meia vida t<sub>1/2</sub> (min)</b>
1	Laranja 122	50	5	30	99,40	0,1710	0,995	4,05
							9	
2	Amarelo 2R	50	5	30	100,00	0,3016	0,996	2,30
							1	
3	Vermelho 5B/35	50	5	30	99,30	0,1963	0,994	3,53
							6	

Fonte: Autor, 2020.

## 5.6 Efluentes tratados por Foto-Fenton no bioensaio com alface

### 5.6.1 Laranja 122

Para o corante reativo Laranja 122, levando em consideração o controle 1 (água destilada), o qual espera-se um melhor desenvolvimento dos três fatores de controle em uma análise de variância (ANOVA) utilizando o software estatístico GraphPad Prism 7, foi determinada que não houve diferença significativa entre as concentrações utilizadas com o controle a um nível de confiança de 95% com parâmetros calculados apresentados na Tabela 29 e 30 para o alongamento da parte aérea e raiz respectivamente.

Tabela 29. Parâmetros calculados pela ferramenta estatística GraphPad Prism 7 para a análise de variância a 95% de limite de confiança para o alongamento da parte aérea

ANOVA	SQ	GL	QM	Estat. F	P-valor
<b>Tratamento (entre colunas)</b>	717,4	6	119,6	F (6, 308) = 1,54	P=0,1647
<b>Resíduo (dentro das colunas)</b>	23918	308	77,65		
<b>Total</b>	24635	314			

Onde: SQ= Soma dos Quadrados; GL= Grau de Liberdade; QM= Quadrados Médios  
Fonte:Autor, 2020.

Tabela 30. Parâmetros calculados pela ferramenta estatística GraphPad Prism 7 para a análise de variância a 95% de limite de confiança para o alongamento da raiz

ANOVA	SQ	GL	QM	Estat. F	P-valor
<b>Tratamento (entre colunas)</b>	599,5	6	99,92	F (6, 275) = 3,869	P=0,0010
<b>Resíduo (dentro das colunas)</b>	7103	275	25,83		
<b>Total</b>	7702	281			

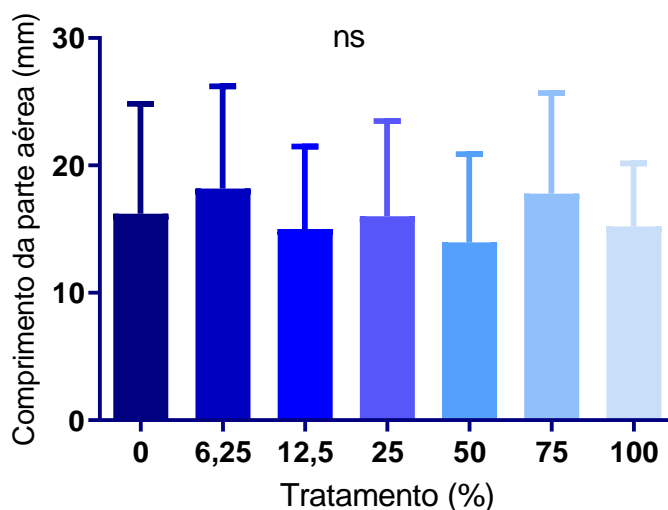
Onde: SQ= Soma dos Quadrados; GL= Grau de Liberdade; QM= Quadrados Médios  
Fonte:Autor, 2020.

O Teste F calculado indicou que a variável alongamento da parte área não apresentou diferença significativa dos diferentes tratamentos em relação ao

controle, mas já para o alongamento da raiz o mesmo teste indicou que houve um ou mais tratamentos que diferiram do controle, sendo necessária aplicação do teste de Dunnett para identifica-los.

O teste de Dunnett para o alongamento da parte aérea não apresentou diferença significativa em nenhuma das concentrações analisadas em relação ao controle 1. Essa conclusão pode ser tida de uma forma mais visual pela Figura 42, onde as concentrações apresentam um crescimento muito próximo ao controle 1. Já o mesmo teste para o alongamento da raiz apresentou diferença significativa entre a concentração de 50% em relação ao controle 1. Esse efeito perceptível pela Figura 43, onde tem-se quase todas as concentrações apresentando médias próximas ao controle. Esta análise aponta um possível efeito tóxico inibitório no parâmetro alongamento da raiz.

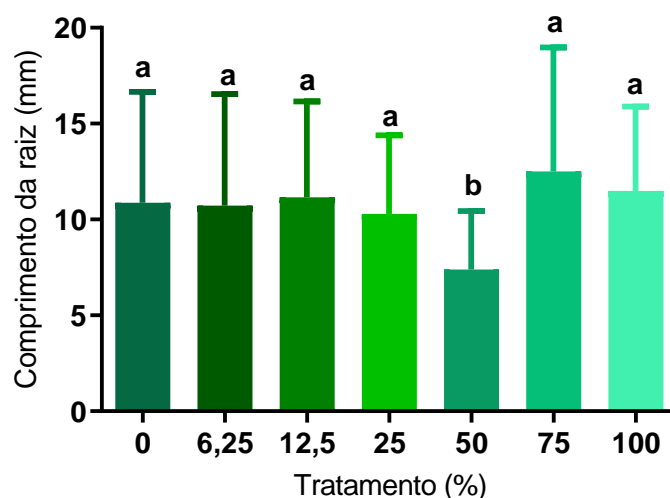
Figura 42. Crescimento da parte aérea das plântulas de alface em diferentes controles e diferentes concentrações do corante reativo vermelho 5B (tratado)



Fonte: Autor, 2020.



Figura 43. Alongamento da raiz das plântulas de alface em diferentes controles e diferentes concentrações do corante reativo vermelho 5B (tratado)



Fonte: Autor, 2020.

### 5.6.2 Amarelo 2R

Para o amarelo 2R levando em consideração o controle 1 (água destilada), o qual espera-se um melhor desenvolvimento dos três fatores de controle em uma análise de variância (ANOVA) utilizando o software estatístico GraphPad Prism 7, foi determinada que não houve diferença significativa entre as concentrações utilizadas e controle 1 a um nível de confiança de 95% para as medidas do crescimento da parte aérea e raiz com parâmetros calculados apresentados na Tabela 31, 32 respectivamente.

Tabela 31. Parâmetros calculados pela ferramenta estatística GraphPad Prism 7 para a análise de variância a 95% de limite de confiança para o alongamento da parte aérea

ANOVA	SQ	GL	QM	Estat. F	P-valor
<b>Tratamento (entre colunas)</b>	717,4	6	119,6	F (6, 308) = 1,54	P=0,1647
<b>Resíduo (dentro das colunas)</b>	23918	308	77,65		
<b>Total</b>	24635	314			

Onde: SQ= Soma dos Quadrados; GL= Grau de Liberdade; QM= Quadrados Médios

Fonte: Autor, 2020.

Tabela 32. Parâmetros calculados pela ferramenta estatística GraphPad Prism 7 para a análise de variância a 95% de limite de confiança para o alongamento da raiz

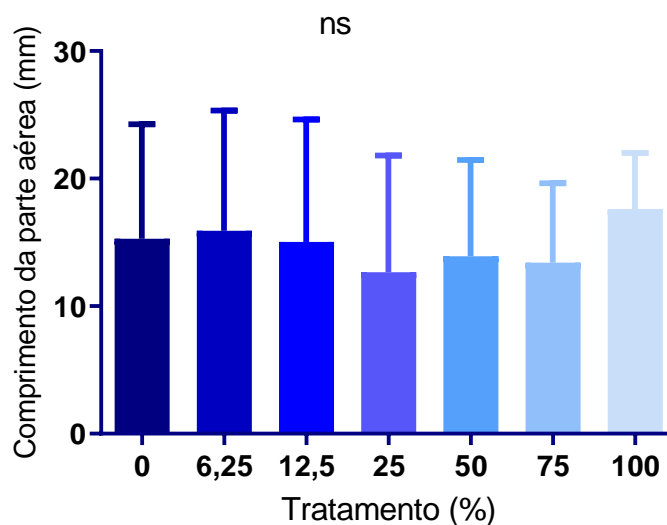
ANOVA	SQ	GL	QM	Estat. F	P-valor
<b>Tratamento (entre colunas)</b>	602,4	6	100,4	F (6, 308) = 2,041	P=0,0601
<b>Resíduo (dentro das colunas)</b>	15152	308	49,19		
<b>Total</b>	15754	314			

Onde: SQ= Soma dos Quadrados; GL= Grau de Liberdade; QM= Quadrados Médios

Fonte: Autor, 2020.

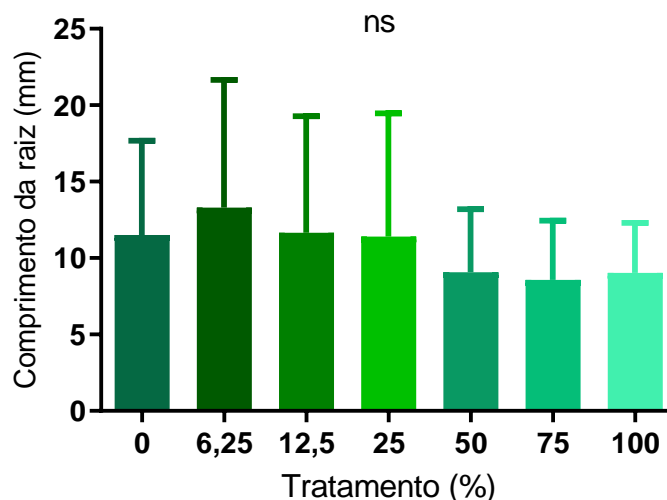
O Teste F calculado indicou que as variáveis alongamento da parte aérea e raiz não apresentaram diferença significativa dos diferentes tratamentos em relação ao controle a um nível de confiança de 95%.

Figura 44. Crescimento da parte aérea das plântulas de alface em diferentes controles e diferentes concentrações do corante reativo vermelho 5B (tratado)



Fonte: Autor, 2020.

Figura 45. Alongamento da raiz das plântulas de alface em diferentes controles e diferentes concentrações do corante reativo vermelho 5B (tratado)



Fonte: Autor, 2020.

### 5.6.3 Vermelho 5B/35

Para o vermelho 5B levando em consideração o controle 1 (água destilada), o qual espera-se um melhor desenvolvimento dos três fatores de resposta em uma análise de variância (ANOVA) utilizando o software estatístico GraphPad Prism 7, foi determinada que houve diferença significativa entre todas as concentrações utilizadas e o controle 1 a um nível de confiança de 95% para o alongamento da parte aérea e raiz com parâmetros calculados apresentados na Tabela 33 e 34 respectivamente.

Tabela 33. Parâmetros calculados pela ferramenta estatística GraphPad Prism 7 para a análise de variância a 95% de limite de confiança para o alongamento da parte aérea

ANOVA	SQ	GL	QM	Estat. F	P-valor
<b>Tratamento (entre colunas)</b>	301,8	6	50,30	F (6, 289) = 0,9970	P=0,4275
<b>Resíduo (dentro das colunas)</b>	14579	289	50,45		
<b>Total</b>	14880	295			

Onde: SQ= Soma dos Quadrados; GL= Grau de Liberdade; QM= Quadrados Médios  
Fonte: Autor, 2020.

Tabela 34. Parâmetros calculados pela ferramenta estatística GraphPad Prism 7 para a análise de variância a 95% de limite de confiança para o alongamento da raiz

ANOVA	SQ	GL	QM	Estat. F	P-valor
<b>Tratamento (entre colunas)</b>	2642	6	440,4	F (6, 308) = 40,69	P<0,0001
<b>Resíduo (dentro das colunas)</b>	3333	308	10,82		
<b>Total</b>	5976	314			

Onde: SQ= Soma dos Quadrados; GL= Grau de Liberdade; QM= Quadrados Médios

Fonte: Autor, 2020.

O teste de Dunnett para o alongamento da parte aérea e raiz apresentou diferença significativa em todas as concentrações em relação ao controle 1, como pode ser visto na Tabela 35 e 36. Esse efeito é perceptível pela Figura 46 e 47 para parte aérea e raiz respectivamente, onde as médias estão plotadas e é apresentada seu desvio padrão. Esta análise aponta um possível efeito tóxico e inibitório nos parâmetros alongamento da parte aérea (hipocótilo) e raiz.

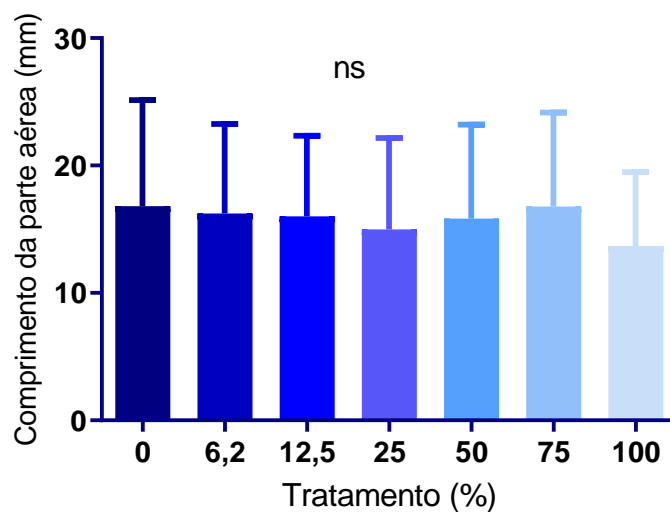
Tabela 35. Análise dos dados de alongamento da parte aérea (mm) da alface usando o teste de Dunnett para as diferentes concentrações do corante

Teste de Dunnett	Diferença média	Intervalo de confiança (95 %)	Significância
Controle 1 vs. 100%	0,5946	-3,430 to 4,620	ns
Controle 1 vs. 75%	0,7970	-3,136 to 4,730	ns
Controle 1 vs. 50%	1,826	-2,199 to 5,851	ns
Controle 1 vs. 25%	0,9792	-2,954 to 4,913	ns
Controle 1 vs. 12,5%	0,03333	-3,967 to 4,034	ns
Controle 1 vs. 6,25%	3,146	-0,9039 to 7,197	ns

Fonte: Autor, 2020.

ns = Não Significativo

Figura 46. Crescimento da parte aérea das plântulas de alface em diferentes controles e diferentes concentrações do corante reativo vermelho 5B (tratado)



Fonte: Autor, 2020

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, de acordo com o teste de Dunnett ( $p \leq 0,05$ )

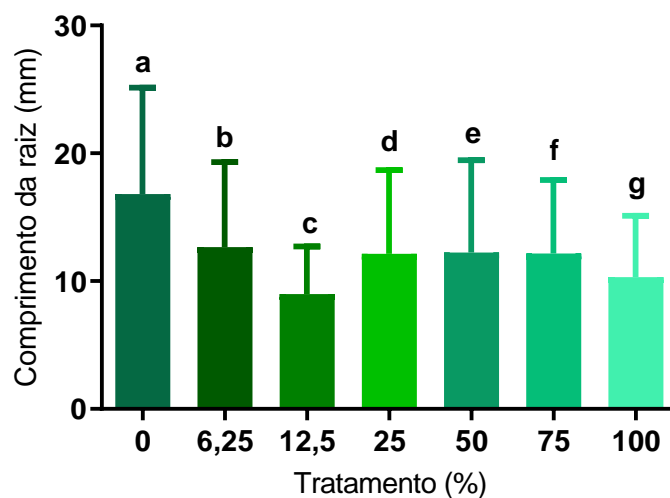
Tabela 36. Análise dos dados de alongamento da raiz (mm) da alface usando o teste de Dunnett para as diferentes concentrações do corante

Teste de Dunnett	Diferença média	Intervalo de confiança (95 %)	Significância
Controle 1 vs. 100%	7,556	5,766 to 9,345	****
Controle 1 vs. 75%	8,398	6,608 to 10,19	****
Controle 1 vs. 50%	8,442	6,652 to 10,23	****
Controle 1 vs. 25%	8,689	6,899 to 10,48	****
Controle 1 vs. 12,5%	8,147	6,357 to 9,937	****
Controle 1 vs. 6,25%	8,107	6,317 to 9,897	****

Fonte: Autor, 2020.

\*\*\*\* = Muito Significativo

Figura 47. Alongamento da raiz das plântulas de alface em diferentes controles e diferentes concentrações do corante reativo vermelho 5B (tratado)



Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, de acordo com o teste de Dunnett ( $p \leq 0,05$ )

Fonte: Autor, 2020.

A amostra controle apresentou diferença significativa quando equiparada as amostras, com concentrações diferentes, do corante vermelho. Assim, percebe-se que apesar do tratamento, este corante ainda possui ação tóxica diante a raiz de plântulas de alface, impedindo assim seu desenvolvimento (Figura 47).

De acordo com o proposto pelos autores como Pérez, et al. (2012) e Bagur-González, et al. (2010), os parâmetros de inibição foram calculados, esses estão presentes na Tabela 37. Na germinação o corante Laranja apresentou o mais alto valor de inibição (-0,89) na concentração de 25%. Para o Amarelo a única inibição observada neste parâmetro foi na concentração de 50% (-0,05), já para o Vermelho todas as concentrações apresentaram inibição na germinação das sementes de alface variando entre -0,01 a -0,19. No alongamento da raiz o Laranja apresentou um estímulo na concentração de 75% (0,50), mas demonstrando inibição em todas as outras concentrações. O Amarelo demonstrou estímulo nas concentrações de 75%, 12,5% e 6,25% e inibição em 100% e 50%, já para o Vermelho todas as concentrações apresentaram inibição neste parâmetro. No alongamento da parte aérea (hipocótilo) o Laranja apresentou estímulos em 75%, 50%, 25% e 6,25% e inibição em 100% e 12,5%. Para o Amarelo houveram inibições desse parâmetro

em 75%,50% e 25% e o estímulo em 100%, 12,5% e 5,25%, já para o Vermelho todas as concentrações apresentaram inibição neste parâmetro.

Tabela 37. Índices de toxicidades para o bioensaio com alface

[ ] %	Laranja			Amarelo			Vermelho		
	IG	IR	IH	IG	IR	IH	IG	IR	IH
<b>100</b>	0	-0,01	-0,01	0	-0,23	0,16	-0,19	-0,69	-0,61
<b>75</b>	0,02	0,50	0,14	0,02	0,21	-0,08	-0,14	-0,77	-0,70
<b>50</b>	0,02	-0,22	0,06	-0,05	-0,13	-0,13	-0,17	-0,78	-0,75
<b>25</b>	-0,89	-0,04	0,10	0,02	0	-0,15	-0,14	-0,80	-0,79
<b>12,5</b>	-0,05	-0,06	-0,06	0,02	0,02	0,01	-0,12	-0,75	-0,74
<b>6,25</b>	-0,05	-0,01	0,16	0,02	0,17	0,10	-0,01	-0,74	-0,74

Fonte: Autor, 2020.

Fica evidente por esta avaliação que os efeitos inibitórios, assim como observados pela análise de variância (ANOVA) para o corante Vermelho 5B que foram significativos, confere a esse corante maior efeito tóxico em alface que os outros dois corantes após o seu tratamento.

### 5.7 Avaliação toxicológica estimada das espécies formadas

Segundo ZANONI; YAMANAKA (2016) as espécies de radiculares OH, são capazes de realizar a total mineralização dos corantes levando a formação de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), água (H<sub>2</sub>O) e outros íons inorgânicos em solução. Uma vez, que a reação de Fenton é parada após determinado tempo, a verificação da total mineralização é dada pela demanda química de oxigênio (DQO) na qual se for obtido valores superiores a zero, indicará a que a total mineralização não ocorreu, restando assim espécies intermediárias desta reação em solução, as quais podem apresentar maior toxicidade que a espécie inicial.

A toxicidade do produto final desta reação foi verificada a partir da ferramenta T.E.S.T (Toxicity Estimate Software Tool) versão 4.2 da Agência dos Estados Unidos de proteção ambiental. Essa ferramenta utiliza um modelo matemático (relação de atividade de estrutura quantitativa - QSARs) para prever a toxicidade de acordo com as características físicas e estrutura química

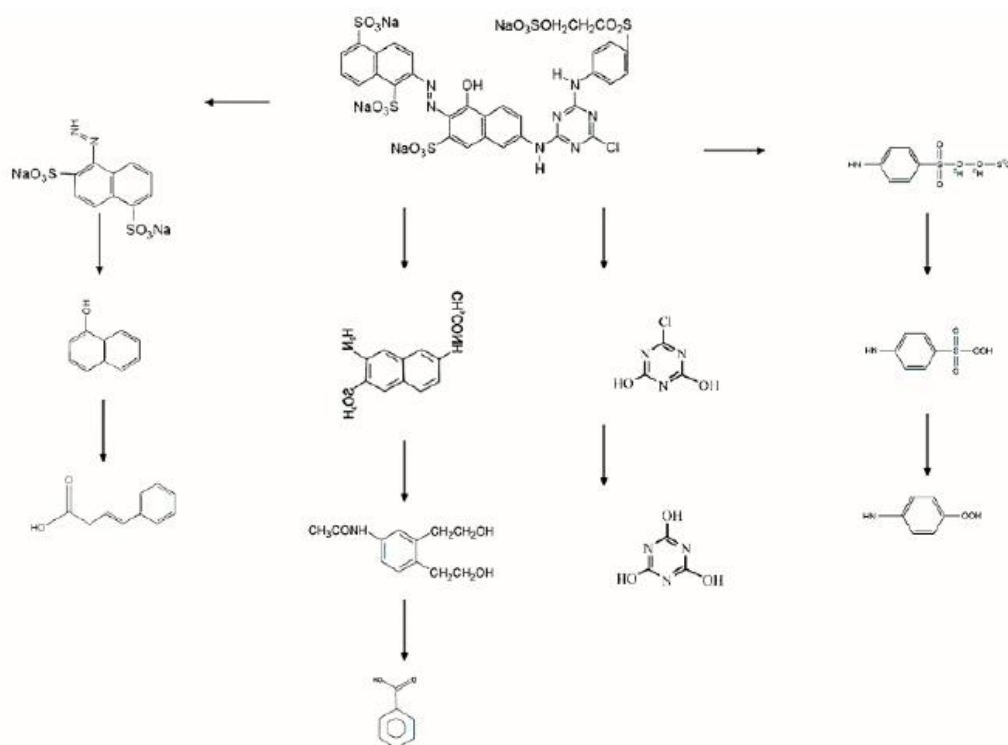
de várias substâncias. O método escolhido para realizar esta análise no programa foi de consenso no qual a toxicidade prevista é estimada de acordo com uma média das toxicidades previstas dos métodos QSAR. As previsões de toxicidade QSAR podem ser utilizadas para rastrear compostos não testados, com finalidade de estabelecer prioridades e possíveis níveis de toxicidade (US EPA, 2016).

Na figura 48 é possível acompanhar o mecanismo de degradação do corante reativo Laranja 122 proposto por Radi e colaboradores (2018). Segundo Ferreira (2019), os produtos finais dessa degradação em sua reação foram o ácido acético e o ácido fórmico. Assim como o ácido benzoico do mecanismo da Figura 39, o ácido acético e fórmico foram avaliados pela ferramenta T.E.S.T, com seus resultados presentes no anexo deste trabalho, juntamente com os valores calculados para os outros métodos, uma vez, que o método de consenso avalia a toxicidade com base nos valores obtidos por outros métodos. Deste modo, os ácidos fórmico e acético foram capazes por essa predição de desenvolver efeito tóxico em humanos e animais (MARTIN, 2016).

O ácido fórmico pode apresentar toxicidade dependente do percurso metabólico percorrido, assim como o tipo de exposição. Em humanos e outros primatas o ácido fórmico proveniente da oxidação do formaldeído pela ação de duas enzimas: a aldeído-desidrogenase e formaldeído-desidrogenase. Sua eliminação do organismo é lenta em relação a seu progenitor, podendo este ser metabolizado ou não, com sua exposição em altas concentrações é causadora de acidose metabólica, cegueira, efeitos no sistema nervoso central e a morte (COELHO, 2009).



Figura 48. Mecanismo da reação de degradação do Laranja 122 proposto por Raid e colaboradores (2018)



Fonte: RADl et al., 2018.

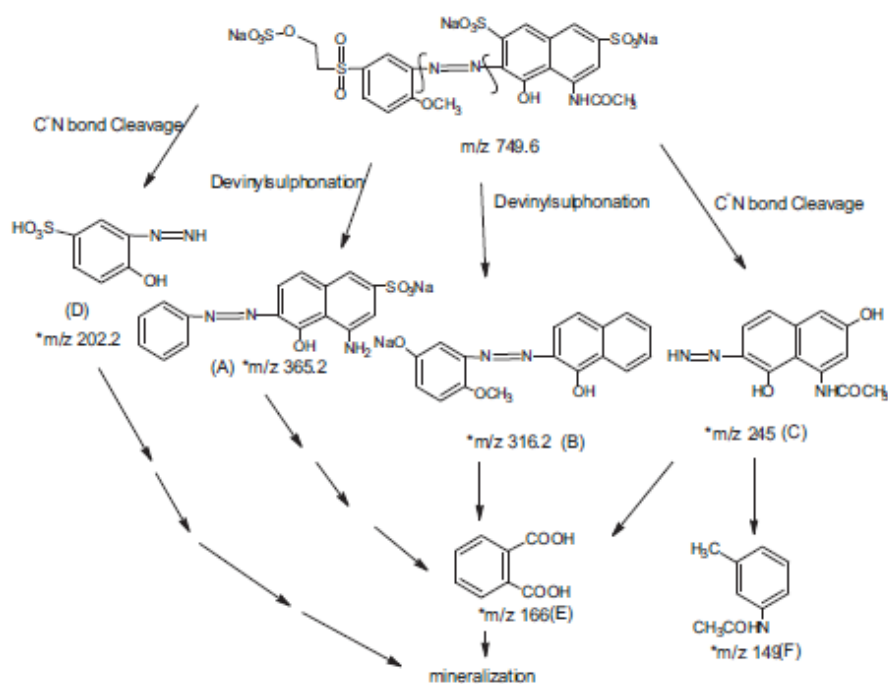
Para o corante reativo Amarelo 2R não foi possível encontrar um mecanismo proposto para sua degradação em nenhuma base de dados, mas Aye e colaboradores (2003) em seu trabalho descrevem que mesmo após o tratamento, a análise por HPLC indicou a presença de alguns intermediários em solução, sendo as menores concentrações de intermediários relacionados a formação de  $\text{CO}_2$ , acetato formados no estágio inicial de degradação. Em uma quantificação por cromatografia iônica foi determinada as porcentagens de cloretos, sulfatos, nitratos e nitritos, sendo estas de 71,4%, 27,99% e 0,78% respectivamente.

Para Vermelho 5B o possível mecanismo da degradação do corante foi proposto por Bansal; Sud (2013) no seu trabalho em condições otimizadas, podendo esse ser observado na Figura 49. Os intermediários dessa reação são formados principalmente pela clivagem da ligação C-N e do grupo divinil sulfona, levando assim a formação de ácido ftálico e m-acetotoluidina. Estas espécies foram avaliadas pelo programa teste e seus resultados estão presente no anexo deste trabalho. A predição de toxicidade indica que apenas o do ácido ftálico é o

que tem a capacidade de desenvolver efeitos negativos em humanos e animais (MARTIN, 2016).

Os ftalatos que são ésteres de ácido ftálico, estes podem entrar e serem excretados do organismo humanos por várias rotas. Sua aplicação inclui produtos de higiene pessoal e cosméticos e também é encontrado em adesivos, sacos plásticos, entre outros. Esses compostos têm sido extensivamente estudados devido a seu potencial tóxico significativo. Algumas dessas espécies interferem no sistema endócrino como superestimulantes, esses imitam o estrogênio e androgênio ligando-se ao receptor e bloqueando a ligação das hormonas (MONTEIRO, 2017).

Figura 49. Mecanismo da reação de degradação do Vermelho 5B/35 proposto por Bansal; Sud (2013)



Fonte: BRANSAL; SUD (2013).

## 6 CONCLUSÃO

A revisão bibliográfica foi capaz de conseguir apurar quais os principais parâmetros que possuem efeitos sobre a realização do bioensaio, assim como desenvolvimento das espécies de alface (*Lactuca sativa* L.). Nessa análise foi determinada que 15 sementes, 5 mL de solução, placas de Petri de 90 mm e ausência de luz demonstram melhores desenvolvimento nas variáveis de resposta analisadas neste trabalho.

A reação de Foto-Fenton em escala de bancada com a concentração de peróxido de hidrogênio de 50 mg/L e sulfato de ferro de 5 mg/L apresentou alta taxas de descoloração chegando a 100% no corante reativo Amarelo 2R e de 99,40 e 99,30 para Laranja 122 e Vermelho 5B, respectivamente. Constatou-se que esta reação para os três corantes segue uma cinética de primeira ordem, sendo assim, existe uma afinidade entre a concentração do corante e as concentrações de  $H_2O_2$  e  $Fe^{2+}$ . Menores concentrações dos azocorantes levará a um aumento na velocidade do processo de oxidação.

No teste de toxicidade com alface para os corantes brutos, observou-se efeito inibitórios significativos para todos os corantes na variável alongamento da raiz. Já para os corantes pós-tratamento Foto-Fenton apenas o corante Vermelho 5B apresentou diferença significativa a um nível de confiança de 95% ( $\alpha=0,05$ ) em todas variáveis de resposta. Sendo esse o corante com comportamento tóxico mais relevante pós-tratamento, tendo como possível causa a ser estudada a sua não mineralização completa no tempo de reação observada.

A avaliação toxicológica pela ferramenta T.E.S.T é apenas uma predição, e leva em consideração diversos fatores como estrutura e comportamento estudados por outros autores, estipulando um determinado comportamento real da substância com organismo humano e animal.

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA, E; et al. Tratamento de efluentes industriais por processos oxidativos na presença de ozônio. **Química Nova**, v. 27, n. 5, 818–824, 2004.

ARCY, A.R.; et al. Testes ecotóxicológicos de diferentes formulações do bioinseticida produzido na UNIVILLE submetidas ao teste de prateleira. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 19, n. 4, 435–440, 2014.

AQUINO, S.F.; SILVA, S.Q.; CHERNICHARO, C.A.L. Practical aspects of the chemical oxygen demand (COD) test applied to the analysis of anaerobic effluents. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 11, n. 4, 295–304, 2006.

ARAÚJO, Ademir Sérgio Ferreira; MONTEIRO, Regina Teresa Rosim. Plant bioassays to assess toxicity of textile sludge compost. **Scientia Agricola**, v. 62, n. 3, 286–290, 2005.

ASTM. **Standard Guide for Conducting Terrestrial Plant Toxicity Tests** E1963-02. n. April, 1–23, 2003.

ANJOS, A. **Curso Planejamento de Experimentos I**. Universidade Federal do Paraná, p. 1–98, 2005. Disponível em: <https://docs.ufpr.br/~aanjos/CE213/apostila.pdf>. Acesso, setembro 2020.

ARAÚJO, K. S.; et al. A tecnologia de remoção de fósforo: Gerenciamento do elemento em resíduos industriais. **Revista Ambiente e Água**, v. 11, n. 2, 445–458, 2016.

ALATON, I. A.; TEKSOY, S.; Acid dyebath effluent pretreatment using Fenton's reagent: Process optimization, reaction kinetics and effects on acute toxicity. **Dyes and Pigments**, Volume 73, Issue 1, 2007, Pages 31-39, ISSN 0143-7208. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2005.09.027>

AYE, T.; ANDERSON, W.A.; MEHRVAR, M.. Photocatalytic treatment of cibacron brilliant yellow 3G-P (reactive yellow 2 textile dye). **Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering**, v. 38, n. 9, 1903–1914, 2003.

DUTKA, B.J. Canada Centre for Inland Waters. Methods for Microbiological and Toxicological Analysis of Waters, **Wastewaters and Sediments**. 1989.

BAGUR-GONZÁLEZ, M.G.; et al. Toxicity assessment using *Lactuca sativa* L. bioassay of the metal(loid)s As, Cu, Mn, Pb and Zn in soluble-in-water saturated soil extracts from an abandoned mining site. **Journal of Soils and Sediments**, v. 11, n. 2, 281–289, 2010.

BANSAL, P; SUD, D. Photocatalytic degradation of commercial dye, CI Reactive Red 35 in aqueous suspension: Degradation pathway and identification of intermediates by LC/MS. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 374–375, 66–72, 2013.

BELTRAMIN, G.D.R.. **Estudo da Estabilidade de Corantes Azo Utilizados em Alimentos por Espectrofotometria Uv-Visível**. 2012. 99 folhas. Dissertação (Mestre em Ciências de Alimentos), Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 2012.

BROWN, T. L.; et al.. **Química la ciencia central**. Novena edición. Pearson, 2004.

CAMPAGNA-FERNANDES, A.F; MARIN, E.B; PENHA, T.H.F.L. Application of root growth endpoint in toxicity tests with lettuce (*Lactuca sativa*). **Ecotoxicology and Environmental Contamination**, v. 11, n. 1, 27–32, 2016.

CÂNDIDO, A. C. S.; SCHMIDT, V.; LAURA, V. A.; et al. Potencial alelopático da parte aérea de *Senna occidentalis* (L.) Link (Fabaceae, Caesalpinioideae): bioensaios em laboratório. **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, n. 1, p. 235–242, 2010.

CASTRO, P. R. C.; KLUGE, R. A.; PERES, L. E. P. **Manual de Fisiologia Vegetal: Teoria e Prática**. Piracicaba: Editora Agronomica Ceres. 2005. 650 p.

COELHO, A. P. D. Caracterização fenotípica e determinação do sistema de cruzamento de *Elionurus muticus*. 2018. 119 folhas. Tese (Doutorado em Fitotecnia), Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia Faculdade de Agronomia Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre (RS), 2018.

COELHO, M.C.S.D.M. O formaldeído em ambiente laboral: determinação do ácido fórmico em urina de trabalhadores de uma fábrica produtora de formaldeído. 2009. 142 folhas. Dissertação (Mestre em Tóxicologia Analítica, Clínica e Forense), Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Porto (Portugal), 2009.

COSTA, J.A; et al. Comprimento e índice de expansão radial do hipocótilo de cultivares de soja. **Ciência Rural**, v. 29, n. 4, 609–612, 1999.

CHAN-KEB, C.A.; et al. Acute toxicity of water and aqueous extract of soils from Champotón river in *Lactuca sativa* L. **Tóxicology Reports**, v. 5, n. November 2017, 593–597, 2018.

CHARLES, J.; et al. Evaluation of the phytotoxicity of polycontaminated industrial effluents using the lettuce plant (*Lactuca sativa*) as a bioindicator. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 7, 2057–2064, 2011.

DIAS, L.K. **Sementes de alface com e sem priming peletizadas com diferentes colorações**. 2014. 60 folhas. Dissertação (Mestre em Ciências), Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS, 2014.

EMINO, E.R.; WARMAN, P.R. Biological assay for compost quality. **Compost Science and Utilization**, v. 12, n. 4, 342–348, 2004.

FRANCO, H. A.; et al. Ecotoxicidade de lixiviado de aterro sanitário na germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa* L.) e pepino (*Cucumis sativus* L.). **Revista de Estudos Ambientais**, v. 19, n. 1, 36, 2017.

FJÄLLBORG, B.; GUSTAFSSON, N. Short-term bioassay responses to sludge products and leachate. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 51, n. 3, 367–376, 2006.

FLORIANO, EP. Germinação e dormência de sementes florestais, Caderno Didático nº 2, 1ª ed./ Eduardo P. Floriano Santa Rosa, 2004. 19 p. Disponível em: <[http://files.engflorestal.webnode.com.br/200000012-72bd573b79/Germinação e Dormência de sementes florestais.pdf](http://files.engflorestal.webnode.com.br/200000012-72bd573b79/Germinação_e_Dormência_de_sementes_florestais.pdf)>. Acesso, julho de 2020.

FONSECA, R. **Terminibição em sementes de alface em função da posição da flor e do armazenamento**. 2016. 60 p. folhas. Dissertação (mestrado em Fitotecnia), Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, 2016.

FORGET, G.; et al. Preliminary data of a single-blind, multicountry trial of six bioassays for water toxicity monitoring. **Environmental Toxicology**, v. 15, n. 5, 362–369, 2000.

GARCIA, J.C.; et al. Evolutive follow-up of the photocatalytic degradation of real textile effluents in TiO<sub>2</sub> and TiO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> systems and their toxic effects on *Lactuca sativa* seedlings. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 9, 1589–1597, 2009.

GARCIA, C. H. Tabelas Para Classificação Do Coeficiente De Variação. **Piracicaba - IPEF**, n. 171, 1989, 10p.

GRANGEIRO, R.V.T.; et al. Caracterização física, química e toxicológica da água de lavagem gerada na produção de biodiesel. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 9, n.1, 78–83, 2014.

GALDÁMEZ, E.V.C; CARPINETTI, L.C.R.. Aplicação das técnicas de planejamento e análise de experimentos na melhoria da qualidade de um processo de fabricação de produtos plásticos. São Carlos, 2002. Disponível em:[https://www.researchgate.net/publication/228700842\\_Aplicacao\\_das\\_Tecnicas\\_de\\_Planejamento\\_e\\_Analise\\_de\\_Experimentos\\_No\\_Processo\\_de\\_Fabricacao\\_de\\_Produtos\\_Plasticos](https://www.researchgate.net/publication/228700842_Aplicacao_das_Tecnicas_de_Planejamento_e_Analise_de_Experimentos_No_Processo_de_Fabricacao_de_Produtos_Plasticos). Acesso, junho de 2020.

GREENE, J.C.; et al. Protocols for short term toxicity screening of hazardous waste sites. **U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C., EPA/600/3-88/029 (NTIS PB88235510)**, 1988.

HAMILTON, M. A.; RUSSO, R.C. & THURSTON, R.U. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environm Sci Technol.*, 11(7): 714-719, 1977.

HENZ, G. P.; SUINAGA, F.; Tipos de alface cultivados no Brasil. **Embrapa Hortaliças - Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, v. 75, n. 36477, p. 1–7, 2009. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/783588>. Acesso, junho de 2020.

JIMÉNEZ, S. et al. State of the Art of Produced Water Treatment. **Chemosphere**, v. 192, 186-208, 2018.

MARTIN, T. User's Guide for T.E.S.T. (version 4.2) (Toxicity Estimation Software Tool) A Program to Estimate Toxicity from Molecular Structure. p. 63, 2016. Disponível em: <<https://www.epa.gov/sites/production/files/2016-05/documents/600r16058.pdf>>.

LALLANA, M. C.; BILLARD, C. E.; ELIZALDE, J. H.; *et al.* Germination bioassay of *Lactuca sativa* (L.): To determine water quality in irrigation dams. **Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias**, v. 40, n. 1, p. 29–38, 2008.

MARTÍNEZ-GARCÍA, J; MONTE, E.; CANTÓN, F.J.R. Fitocromos y desarrollo vegetal. **Investigación y ciencia**, n. 305, 20–29, 2002.

MELO, S.; SANTOS, A.; TROVÓ, A. G.; BAUTITZ, I. R.; *et al.* Degradação de fármacos residuais por processos oxidativos avançados. **Química Nova**, v. 32, n. 1, 188–197, 2009.

MENEZES, N.L.; *et al.* Qualidade fisiológica de sementes de alface submetidas a diferentes temperaturas na presença e ausência de luz **Ciência Rural**, v.30, n.6, 941-945, 2000.

MOAWAD, H.; ABD EL-RAHIM, W. M.; KHALAFALLAH, M. Evaluation of biotoxicity of textile dyes using two bioassays. **Journal of Basic Microbiology**, v. 43, n. 3, 218–229, 2003.

MONTEIRO, B.E.S. Toxicidade dos produtos cosméticos. 2017. 83 folhas. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto (Portugal), 2017.

MONTGOMERY, D.C. Design and Analysis of Experiments - Eighth Edition. Design and Analysis of Experiments Eighth Edition. **Arizona State University**. John Wiley & Sons, Inc. 2012.

MONTGOMERY, D.C. Design and Analysis of Experiments. New York: John Wiley and Sons, 1991.

- MUÑOZ, E. H.; et al. Toxicidad de Fertilizantes Orgánicos Estimada con Bioensayo de Germinación de Lechuga. **Terra Latinoamericana**, v. 33, n. 2, 179–185, 2015.
- NAGEL-HASSEMER, et al. Processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como pós-tratamento para remoção de cor e polimento final em efluentes têxteis. **Química Nova**, v. 35, n. 5, 900–904, 2012.
- NASCIMENTO, W. M.; CANTLIFFE, D. J. Germinação de sementes de alface sob altas temperaturas. **Horticultura Brasileira**, v. 20, n. 1, 03–106, 2002.
- NEAMTU, M.; et al. Oxidation of commercial reactive azo dye aqueous solutions by the photo-Fenton and Fenton-like processes. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 161, n. 1, 87–93, 2003.
- NILSEN, E. T.; et al. Inhibition of seedling survival under *Rhododendron maximum* (Ericaceae): Could allelopathy be a cause? **American Journal of Botany**, v. 86, n. 11, 1597–1605, 1999.
- ONU. Making Every Drop Count-An Agenda for Water Action. **HLPWater Outcome Report**, n. March, 234, 2018.
- OLIVEIRA, A. F. G. Testes Estatísticos para Comparação de Médias. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 5, n. 6, 777–788, 2008.
- OLIVEIRA, B.H.; et al. Plant growth regulation activity of steviol and derivatives. **Phytochemistry**, v. 69, n. 7, 1528–1533, 2008.
- OECD. Lemna sp. Growth Inhibition Test. **Oecd Guidelines for the Testing of Chemicals**, n. July, p. 22, 2002. Disponível em: <<http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/1948054.pdf>>.
- PERECIN, D.; CARGNELUTTI FILHO, A.. Efeito por comparações e por experimento em interações de experimentos fatoriais. p. 68–72, 2008.
- PÉREZ, Y. G.; ALBEAR, E. M.; PÉREZ, N.; et al. Aplicación de un bioensayo ecotoxicológico en la evaluación de una mezcla compleja ambiental APPLICATION OF ECOTÓXICOLOGIC BIOASSAY IN THE EVALUATION OF AN. **Higiene y Sanidad Ambiental**, v. 12, n. 1, p. 839–845, 2012.
- PRIAC, A.; BADOT, P. M.; CRINI, G. Évaluation de la phytotoxicité d'eaux de rejets via *Lactuca sativa* : paramètres des tests de germination et d'élongation. **Comptes Rendus - Biologies**, v. 340, n. 3, 188–194, 2017.
- PAESE, C.; CATEN, C.; RIBEIRO, J. L. D. Aplicação da análise de variância na implantação do CEP. **Production**, v. 11, n. 1, p. 17–26, 2001.
- PÉREZ, Y. G.; ALBEAR, E. M.; PÉREZ, N.; et al. Aplicación de un bioensayo ecotoxicológico en la evaluación de una mezcla compleja ambiental. **Higiene y Sanidad Ambiental**, v. 12, n. 1, 839–845, 2012.



- QUEIJA, C.; QUEIRÓS, M. A.; RODRIGUES, L. M. A cor dos Alimentos. *Química – Boletim da Sociedade Portuguesa de Química*, v. 80, p. 6 – 11, 2001.
- RAMOS, J.M.P. Estudo e aplicação de processos oxidativos avançados e ecotóxicológicos no tratamento de efluente contendo verde malaquita. 2018. 82 folhas. Dissertação (Mestre em Ciências) Programa de Pós-graduação em Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió-AL, 2018.
- RENOUX, A.Y.; TYAGI, R.D.; SAMSON, R. Assessment of toxicity reduction after metal removal in bioleached sewage sludge. **Water Research**, v. 35, n. 6, 1415–1424, 2001.
- RICE, E.L. Allelopathy: An Update. *Botanical Review*, vol. 45, no. 1, 1979, pp. 15–109. **JSTOR**, [www.jstor.org/stable/4353945](http://www.jstor.org/stable/4353945). Accessed 15 Sept. 2020.
- RADI, M. A.; NASIRIZADEH, N.; MIRJALILI, M.; *et al.* Decolorization of reactive orange 122 as an organic pollutant by the sonoelectrochemical process and toxicity evaluation. **Journal of Applied Biotechnology Reports**, v. 5, n. 3, 117–124, 2018.
- RIBEIRO, L.O.; BARBOSA, S.; BALIEIRO, F. P.; *et al.* Phytotoxicity of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville leaf extracts in lettuce bioassay. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 10, n. 2, p. 220–225, 2012.
- RODRIGUES, L.C.A.; *et al.* Fitotoxicidade e citogenotoxicidade da água e sedimento de córrego urbano em bioensaio com *Lactuca sativa*. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. v.17, n.10,1099–1108, 2013.
- SCHMILDT, R.E.; *et al.* Coeficiente de variação como medida da precisão em experimentos de alface **Revista Agro@ambiente On-line**, v. 11, n. 4, 290-295, 2017.
- SILVA, E.R. Germinação e morfogênese in vitro de *Melanoxylon brauna* Schott. 2019. 66 folhas. **Dissertação** (Mestre em Ciências Florestais), Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, Jerônimo Monteiro-ES, 2019.
- SILVEIRA, B.I. **Cinética Química das Reações Homogêneas**. 2ª edição revista e ampliada. Blucher, 2015, 401p.
- SILVEIRA, G. L.; LIMA, M. G. F.; REIS, G. B.; *et al.* Toxic effects of environmental pollutants: Comparative investigation using *Allium cepa* L. and *Lactuca sativa* L. **Chemosphere**, v. 178, p. 359–367, 2017.
- SIMÕES, M. S.; *et al.* Padronização de bioensaios para detecção de compostos alelopáticos e toxicantes ambientais utilizando alface. **Biotemas**, v. 26, n. 3, 29–36, 2013.

SOBRERO, M. C.; RONCO, A. Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga *Lactuca sativa* L. **Imta**, 55–67, 2004.

TAMADA, I.S.; et al. Biodegradation and toxicological evaluation of lubricant oils. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, n. 6, 951–956, 2012.

TAM, N.F.Y., TIQUIA, S.M.. Assessing toxicity of spent sawdust pig-litter using seed germination technique. **Resource Conservation Recycling**, v.11, 261-274, 1994.

TAVARES, R.G.; et al. Avaliação da toxicidade do lodo de estação de tratamento de água e esgoto, antes e após vermicompostagem, usando teste de germinação com semente de alface (*Lactuca sativa*). **Revista DAE**, v. 67, n. 218, 156–167, 2019.

TIMOSSI, L.; et al. Analysis on quality of work life of employees with different levels of education through an analysis of correlations. **Produção**, v. 20, n. 3, 471–480, 2010.

TIQUIA, S M. Evaluating Phytotoxicity of Pig Manure from the Pig-on-Litter System. **Proceedings of the International Composting Symposium (ICS'99)**, v. 1, 625–647, 2000.

TORRES, M. T. R. Empleo de los ensayos con plantas en el control de contaminantes tóxicos ambientales. **Rev Cubana Hig Epidemiol, Ciudad de la Habana**, v. 41, n. 2-3, dic. 2003. - Disponible en <[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1561-30032003000200009&lng=es&nrm=iso](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-30032003000200009&lng=es&nrm=iso)>. Acesso, setembro de 2020.

USEPA. Protocols for short- term toxicity screening of hazardous waste sites, EPA/600/3–88/029. 1986.

VARNERO, M. T.; ROJAS, C.; ORELLANA, R. Índices de Fitotoxicidad de residuos orgánicos durante el copostage. **Revista ciencia del Suelo y nutrición Vegetal**, v. 7, n. 1, p. 28–37, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4067/S0718-27912007000100003>>.

VAAJASAARI, K.; et al. Comparisons of terrestrial and aquatic bioassays for oil-contaminated soil toxicity. **Journal of Soils and Sediments**, v. 2, n. 4, 194–202, 2002.

VALENTE, J.P.S.; PADILHA, P. M.; SILVA, A.M. M. **Eclética Química**. v. 22, São Paulo. 1997. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-46701997000100005> Oxigênio. Acesso, agosto de 2020.

VALERIO, M. E.; GARCÍA, J. F.; PEINADO, F. M. Determination of phytotoxicity of soluble elements in soils, based on a bioassay with lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Science of the Total Environment**, v. 378, n. 1–2, 63–66, 2007.

VIANA, L. O.; MARTINS, K. G.; SOUZA, K. V.; *et al.* Fitotoxicidade de efluente da indústria cervejeira em sementes de *Lactuca sativa* L. **Revista Internacional de Ciências**, v. 7, n. 2, p. 265–275, 2017.

WANG, M.; CHEN, L.; CHEN, S.; *et al.* Alleviation of cadmium-induced root growth inhibition in crop seedlings by nanoparticles. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 79, p. 48–54, 2012.

XU, X. *et al.* Degradation of dyes in aqueous solutions by the Fenton process. *Chemosphere*, v. 57, p. 595-600, 2004.

YASSIN, N. Análise De Experimentos Fatoriais de Dois Fatores com Tratamentos Adicionais. 2001. 161p.

ZUCCONI F; A. *et al.* Evaluating toxicity of immature compost. **BioCycle**, 1981.

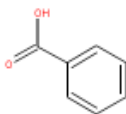
ZANONI, M. V. B.; YAMANAKA, H. Caracterização química, toxicológica, métodos de detecção e tratamento. Editora **UNESP**, São Paulo. 2016, 344p.

**ANEXO**

Predição da toxicidade do ácido benzoico em humano e animais pela ferramenta T.E.S.T no método de consenso

Prediction results

Endpoint	Experimental value	Predicted value
Developmental Toxicity value	N/A	0,36
Developmental Toxicity result	N/A	Developmental NON-toxicant

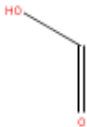
Individual Predictions		Test chemical
Method	Predicted value	
Hierarchical clustering	<a href="#">0,22</a>	
Single model	<a href="#">0,46</a>	
FDA	<a href="#">0,42</a>	
Nearest neighbor	<a href="#">0,33</a>	

Fonte: EPA, 2020.

Predição da toxicidade do ácido fórmico em humano e animais pela ferramenta T.E.S.T no método de consenso

Prediction results

Endpoint	Experimental value	Predicted value
Developmental Toxicity value	N/A	0,73
Developmental Toxicity result	N/A	Developmental toxicant

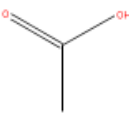
Individual Predictions		Test chemical
Method	Predicted value	
Hierarchical clustering	<a href="#">0,94</a>	
Single model	<a href="#">N/A</a>	
FDA	<a href="#">0,58</a>	
Nearest neighbor	<a href="#">0,67</a>	

Fonte: EPA, 2020.

Predição da toxicidade do ácido acético em humano e animais pela ferramenta T.E.S.T no método de consenso

Prediction results

Endpoint	Experimental value	Predicted value
Developmental Toxicity value	N/A	0,60
Developmental Toxicity result	N/A	Developmental toxicant

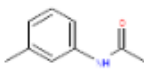
Individual Predictions		Test chemical 
Method	Predicted value	
Hierarchical clustering	<a href="#">0,67</a>	
Single model	<a href="#">0,79</a>	
FDA	<a href="#">0,26</a>	
Nearest neighbor	<a href="#">0,67</a>	

Fonte: EPA, 2020.

Predição da toxicidade do m-acetotoluidina em humano e animais pela ferramenta T.E.S.T no método de consenso

Prediction results

Endpoint	Experimental value	Predicted value
Developmental Toxicity value	N/A	0,44
Developmental Toxicity result	N/A	Developmental NON-toxicant

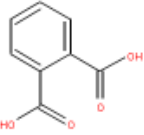
Individual Predictions		Test chemical 
Method	Predicted value	
Hierarchical clustering	<a href="#">0,46</a>	
Single model	<a href="#">0,53</a>	
FDA	<a href="#">0,09</a>	
Nearest neighbor	<a href="#">0,67</a>	

Fonte: EPA, 2020.

Predição da toxicidade do ácido ftálico em humano e animais pela ferramenta T.E.S.T no método de consenso

Prediction results

Endpoint	Experimental value	Predicted value
Developmental Toxicity value	N/A	0,53
Developmental Toxicity result	N/A	Developmental toxicant

Individual Predictions		Test chemical
Method	Predicted value	
Hierarchical clustering	<a href="#">0,43</a>	
Single model	<a href="#">0,76</a>	
FDA	<a href="#">0,60</a>	
Nearest neighbor	<a href="#">0,33</a>	

Fonte: EPA, 2020.