



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE TECNOLOGIA E RECURSOS NATURAIS
UNIDADE ACADÊMICA DE ENGENHARIA CIVIL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA CIVIL E AMBIENTAL

SAMANDA COSTA DO NASCIMENTO

**ECOTOXICIDADE DE LIXIVIADO DE ATERRO SANITÁRIO UTILIZANDO
MINHOCAS E SEMENTES COMO ORGANISMOS-TESTE**

CAMPINA GRANDE

2021

SAMANDA COSTA DO NASCIMENTO

**ECOTOXICIDADE DE LIXIVIADO DE ATERRO SANITÁRIO UTILIZANDO
MINHOCAS E SEMENTES COMO ORGANISMOS-TESTE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil e Ambiental da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito para a obtenção do título de Mestra em Engenharia Civil e Ambiental.

Área de concentração: Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental.

MÁRCIO CAMARGO DE MELO, Dr.
Orientador

LIBÂNIA DA SILVA RIBEIRO, Dra.
Coorientadora

CAMPINA GRANDE

2021

N244e Nascimento, Samanda Costa do.
Ecotoxicidade de lixiviado de aterro sanitário utilizando minhocas e sementes como organismos-teste / Samanda Costa do Nascimento. – Campina Grande, 2021.
109 f. : il. : color.

Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil e Ambiental) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Tecnologia e Recursos Naturais, 2021.
"Orientação: Prof. Dr. Márcio Camargo de Melo; Coorientação: Profª Drª. Libânia da Silva Ribeiro".
Referências.

1. Efluente. 2. Contaminação do Solo. 3. Bioindicadores. 4. Fitotoxicidade. I. Melo, Márcio Camargo de. II. Ribeiro, Libânia da Silva. III. Título.

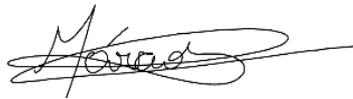
CDU 614.76(043)

SAMANDA COSTA DO NASCIMENTO

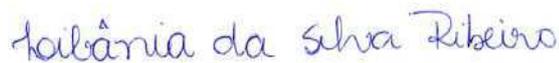
**ECOTOXICIDADE DE LIXIVIADO DE ATERRO SANITÁRIO UTILIZANDO
MINHOCAS E SEMENTES COMO ORGANISMOS-TESTE**

Aprovado em 21 de julho de 2021.

BANCA EXAMINADORA



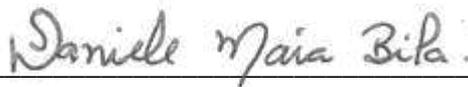
Prof. Dr. Márcio Camargo de Melo
(Orientador)
UFCG/ UAEC/CTRN



Profa. Dra. Libânia da Silva Ribeiro
(Orientadora)
UFCG/ UAEC/CTRN



Profa. Dra. Andréa Carla Lima Rodrigues
(Examinadora interna)
UFCG/PPGECA/CTRN



Profa. Dra. Daniele Maia Bila
(Examinadora externa)
UERJ/DESMA

CAMPINA GRANDE

2021



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
POS-GRADUACAO ENGENHARIA CIVIL AMBIENTAL
Rua Aprigio Veloso, 882, - Bairro Universitario, Campina Grande/PB, CEP 58429-900

REGISTRO DE PRESENÇA E ASSINATURAS

1. **ATA DA DEFESA PARA CONCESSÃO DO GRAU DE MESTRE EM ENGENHARIA CIVIL E AMBIENTAL**
2. **ALUNA: SAMANDA COSTA DO NASCIMENTO / COMISSÃO EXAMINADORA: DR. MÁRCIO CAMARGO DE MELO - PPGECA/UFCG (PRESIDENTE) - ORIENTADOR, DR.ª LIBÂNIA DA SILVA RIBEIRO – PPGECA/UFCG – COORIENTADORA, DR.ª ANDREA CARLA LIMA RODRIGUES – PPGECA/UFCG – EXAMINADORA INTERNA, DR.ª DANIELE MAIA BILA - UERJ/DESMA - EXAMINADORA EXTERNA (PORTARIA 29/2021). / TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: “ECOTOXICIDADE DE LIXIVIADO DE ATERRO SANITÁRIO UTILIZANDO MINHOCAS E SEMENTES COMO ORGANISMOS-TESTE” / ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: GEOTECNIA / HORA DE INÍCIO: 14:00 HORAS / FORMA DA SESSÃO: POR VÍDEO CONFERÊNCIA.**
3. **EM SESSÃO REALIZADA POR VÍDEO CONFERÊNCIA, APÓS EXPOSIÇÃO DE CERCA DE 40 MINUTOS, O CANDIDATO FOI ARGUIDO ORALMENTE PELOS MEMBROS DA COMISSÃO EXAMINADORA, TENDO DEMONSTRADO SUFICIÊNCIA DE CONHECIMENTO E CAPACIDADE DE SISTEMATIZAÇÃO NO TEMA DE SUA DISSERTAÇÃO, SENDO-LHE ATRIBUÍDO O CONCEITO “EM EXIGÊNCIA”, SENDO QUE A POSSIBILIDADE DE APROVAÇÃO ESTÁ CONDICIONADA À AVALIAÇÃO DA NOVA VERSÃO DO TRABALHO FINAL, SEGUINDO PROCEDIMENTOS PREVISTOS NA RESOLUÇÃO DO PROGRAMA. O PRESIDENTE DA COMISSÃO EXAMINADORA, OUVIDOS OS DEMAIS MEMBROS DA COMISSÃO, DEVERÁ FICAR RESPONSÁVEL POR ATESTAR QUE AS CORREÇÕES SOLICITADAS NA LISTA DE EXIGÊNCIAS FORAM ATENDIDAS NA VERSÃO FINAL DO TRABALHO. A COMISSÃO EXAMINADORA CUMPRINDO OS PRAZOS REGIMENTAIS, ESTABELECE UM PRAZO MÁXIMO DE 30 DIAS PARA QUE SEJAM FEITAS AS ALTERAÇÕES EXIGIDAS. APÓS O DEPÓSITO FINAL DO DOCUMENTO DE DISSERTAÇÃO, DEVIDAMENTE REVISADO E MEDIANTE ATESTADO DO ORIENTADOR, ESTE CONCEITO PASSARÁ IMEDIATAMENTE PARA O CONCEITO “APROVADO”. NA FORMA REGULAMENTAR, FOI LAVRADA A PRESENTE ATA, QUE É ASSINADA POR MIM, WELLINGTON LAURENTINO DOS SANTOS, SECRETÁRIO, ALUNO E OS MEMBROS DA COMISSÃO EXAMINADORA PRESENTES.**
4. **CAMPINA GRANDE, 21 DE JULHO DE 2021**
- 5.
- 6.
7. **DANIELE MAIA BILA**



Documento assinado eletronicamente por **MARCIO CAMARGO DE MELO, PROFESSOR(A) DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 29/07/2021, às 15:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 8º, caput, da [Portaria SEI nº 002, de 25 de outubro de 2018](#).



Documento assinado eletronicamente por **WELLINGTON LAURENTINO DOS SANTOS, SECRETÁRIO (A)**, em 29/07/2021, às 18:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 8º, caput, da [Portaria SEI nº 002, de 25 de outubro de 2018](#).



Documento assinado eletronicamente por **Libânia da Silva Ribeiro, Usuário Externo**, em 29/07/2021, às 18:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 8º, caput, da [Portaria SEI nº 002, de 25 de outubro de 2018](#).



Documento assinado eletronicamente por **Samanda Costa do Nascimento, Usuário Externo**, em 30/07/2021, às 20:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 8º, caput, da [Portaria SEI nº 002, de 25 de outubro de 2018](#).



Documento assinado eletronicamente por **ANDREA CARLA LIMA RODRIGUES, PROFESSOR**, em 11/08/2021, às 19:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 8º, caput, da [Portaria SEI nº 002, de 25 de outubro de 2018](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <https://sei.ufcg.edu.br/autenticidade>, informando o código verificador **1662137** e o código CRC **D4D2B208**.

*Aos meus pais, minhas irmãs, a minha sobrinha
Sofia e ao meu amigo e companheiro de vida
Jonas Gouveia por acreditarem em minhas ideias
e por serem meu combustível diário para alcançar
voos mais altos.*

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo Dom da vida e por me dá o sustento e a força para seguir a diante, pois concluir a pesquisa nesse cenário de pandemia foi um desafio, mas nunca deixei de acreditar no propósito de Deus em minha vida.

Aos meus pais (Edvaldo e Verônica) e aos meus irmãos (Samara, Rafaelle e Rafael), pelo incentivo, apoio e por embarcarem junto comigo em todas as minhas aventuras, estando ao meu lado nas horas da dúvida, das dificuldades e nos momentos de especiais que só o aconchego da família há de ter.

A Jonnas Gouveia, pelo apoio e paciência desses últimos anos e por sempre me incentivar a buscar o melhor de mim.

Aos meus orientadores de vida Ruy Portela, Adriano Paz, Aucélio Gouveia e Sr. Cabral, pois se cheguei até aqui foi com conta da dedicação e ensinamentos de cada um deles.

As minhas amigas Vanine, Joany, Jaque e Aline, pelas conversas de motivação.

Aos amigos fiz em Campina Grande em especial Elisa, Naiara, Jordan, Jisla, Thiago e Manu, agradeço pelas boas conversas que tivemos nos laboratórios e nos horários de almoço (embaixo da árvore). Sou grada a Deus por sempre colocar pessoas de bom coração em minha vida e não tenho dúvidas, que cada um deles, foram essenciais para que eu pudesse continuar minha pesquisa.

Agradeço ao Sr. Rosildo, funcionário da UFCG, por fornecer o insumo para a criação das minhocas.

Ao grupo de pesquisa GGA e a todos os membros (professores e pesquisadores) por contribuírem direta e indiretamente. Agradeço especialmente aqueles que me ajudaram a picotar as fibras, medir a temperaturas das caixas e que sempre estava ao meu lado com uma palavra amiga (Marcus, Carlos, Allison e Luísa).

Aos meus orientadores Márcio Camargo de Melo e Libânia Ribeiro da Silva, por acreditarem que seria possível a realização de uma pesquisa, que até então, não tinha sido desenvolvida no grupo de pesquisa. Agradeço ainda pelas belas palavras de incentivo e carinho da minha orientadora Libânia.

Não importa onde você está hoje, mas se Deus te colocou neste lugar, decida florescer em todas as primaveras. Dê o seu melhor mesmo que ainda não seja o lugar que você almejou estar.

NASCIMENTO, S. C. **Ecotoxicidade de lixiviado de aterro sanitário utilizando minhocas e sementes como organismos-teste**. 2021. 109 fls. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil e Ambiental) – Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2021.

RESUMO

A contaminação do ecossistema terrestre ocasionada pelo lixiviado de aterro sanitário pode provocar danos irreparáveis aos organismos do solo, bem como, à saúde humana. Assim, objetivo desse estudo foi determinar a ecotoxicidade de lixiviado *in natura* de aterro sanitário utilizando minhocas da espécie *Eisenia andrei* e sementes de *Solanum lycopersicum*, *Lactuca sativa* e *Brassica oleracea* como organismos-teste. As amostras de lixiviado foram coletadas no Aterro sanitário de Campina Grande, Paraíba, Brasil. A ecotoxicidade do efluente em minhocas *Eisenia andrei* foi determinada por meio dos ensaios de letalidade (preliminar, definitivo e recontaminação) e comportamental de fuga; e em sementes mediante a determinação do crescimento da raiz, crescimento relativo da raiz, germinação relativa da semente, índice de germinação e CE_{50} . Os resultados demonstraram que o lixiviado causou efeito letal as minhocas a partir das concentrações de 25% (26 mL.kg⁻¹), apresentando a CL_{50} de 53% (55,06 mL.kg⁻¹) para o ensaio preliminar e de 56% (58,5 mL.kg⁻¹) para o definitivo. Além disso, observou-se que, as concentrações mais elevadas provocaram deformações no corpo dos organismos e mudança comportamental. Já o ensaio de recontaminação não apresentou elevado efeito letal, no entanto, causou graves danos nas minhocas da espécie *Eisenia andrei*, como o estímulo a automutilagem. O ensaio de fuga mostrou que todas as concentrações de lixiviado no solo, inclusive as menores (10 e 14%), causaram efeito de fuga aos organismos, havendo a perda de habitat na concentração de poluente em 53,8% (55,8 mL.kg⁻¹). A fitotoxicidade do efluente apresentou variações entre as amostras analisadas e entre as espécies, cuja escala de sensibilidade das espécies foi repolho ($CE_{50}= 7,55\%$) < alface ($CE_{50} = 8,52\%$) < tomate ($CE_{50}= 12,20\%$). Ainda foi constatado que o lixiviado fresco é mais fitotóxico que o lixiviado preservado, em que a amostra preservada teve um valor superestimado da CE_{50} . Em relação aos organismos teste utilizados nesse estudo, as três espécies de sementes foram mais sensíveis que as minhocas, pois apresentaram menores valores da CE_{50} , o que mostra que as minhocas foram mais resistentes a contaminação. Concluiu-se que o lixiviado foi tóxico para as espécies estudadas, de modo que o uso dos organismos-teste se mostraram excelentes bioindicadores de contaminação ambiental.

Palavras-chaves: efluente; contaminação do solo; bioindicadores; fitotoxicidade.

NASCIMENTO, S. C. **Ecotoxicity of landfill leachate using earthworms and seeds as test organisms**. 2021. 109 fls. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil e Ambiental) – Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2021.

ABSTRACT

Contamination of the terrestrial ecosystem caused by landfill leachate can cause irreparable damage to soil organisms, as well as to human health. Thus, the aim of this study was to determine the ecotoxicity of in natura landfill leachate using earthworms of the species *Eisenia andrei* and seeds of *Solanum lycopersicum*, *Lactuca sativa* and *Brassica oleracea* as test organisms. Leachate samples were collected at the Campina Grande Landfill, Paraíba, Brazil. The effluent ecotoxicity in *Eisenia andrei* earthworms was determined by means of lethality tests (preliminary, definitive and recontamination) and escape behavior; and in seeds by determining root growth, relative root growth, relative seed germination, germination index and EC_{50} . The results showed that the leachate caused a lethal effect on earthworms from concentrations of 25% (26 mL.kg⁻¹), presenting a LC_{50} of 53% (55.06 mL.kg⁻¹) for the preliminary test and 56% (58.5 mL.kg⁻¹) for the definitive. Furthermore, it was observed that the higher concentrations caused deformations in the bodies of the organisms and behavioral change. The recontamination test did not show a high lethal effect, however, it caused serious damage to earthworms of the species *Eisenia andrei*, such as the stimulus to self-mutilation. The leakage test showed that all leachate concentrations in the soil, including the lowest (10 and 14%), caused the organisms to escape, with a loss of habitat in the pollutant concentration in 53.8% (55.8 mL.kg⁻¹). The effluent phytotoxicity showed variations between the analyzed samples and between the species, whose species sensitivity scale was cabbage (EC_{50} = 7.55%) < lettuce (EC_{50} = 8.52%) < tomato (EC_{50} = 12.20%). It was also found that fresh leachate is more phytotoxic than preserved leachate, in which the preserved sample had an overestimated EC_{50} value. Regarding the test organisms used in this study, the three seed species were more sensitive than the earthworms, as they had lower EC_{50} values, which shows that the earthworms were more resistant to contamination. It was concluded that the leachate was toxic for the studied species, so that the use of test organisms proved to be excellent bioindicators of environmental contamination.

Keywords: effluent; ground contamination; bioindicators; phytotoxicity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Localização do ASCG.....	38
Figura 2 - Células do ASCG e as lagoas de acúmulo e evaporação de lixiviado	39
Figura 3 - Etapas metodológicas da pesquisa.....	40
Figura 4 - Minhoca da espécie <i>Eisenia andrei</i>	42
Figura 5 - Caixa de criação das minhocas.....	43
Figura 6 - Monitoramento da temperatura das caixas de criação	43
Figura 7 - Processo de extração da fibra de coco	44
Figura 8 - Composição do alimento em volume.....	45
Figura 9 - Alimento (a) antes e (b) após a mistura das componentes	45
Figura 10 - Teste de correção de pH do alimento.....	46
Figura 11- Teste da umidade do alimento.....	47
Figura 12 - Teste de aceitação do alimento.....	48
Figura 13 - Composição do SAT (a) antes e (b) após a homogeneização	49
Figura 14 - Organismos em solo-controle para aclimatação	52
Figura 15 - SAT de repouso	52
Figura 16 - Recipientes- teste do ensaio de letalidade.....	53
Figura 17 - Concentrações dos tratamentos utilizados no ensaio preliminar de letalidade	54
Figura 18- Tratamentos utilizados no ensaio definitivo de letalidade	54
Figura 19 - Recipiente-teste do ensaio de fuga (a) e Colocação dos organismos no recipiente-teste (b).....	57
Figura 20 - Curva dose-resposta do ensaio preliminar de letalidade em minhocas <i>Eisenia andrei</i> expostas ao solo contaminado com lixiviado	65
Figura 21- Organismos evitando o solo-teste.....	66
Figura 22 - Características observadas nas minhocas <i>Eisenia andrei</i> após o ensaio preliminar de letalidade quando expostas em solo contaminado com lixiviado nas concentrações de (a) 25% (T4); (b) 50% (T5); (c) 75% (T6); (d) 100% (T7).....	67
Figura 23 - Curva dose-resposta do ensaio definitivo da letalidade em minhocas <i>Eisenia andrei</i> após 14 dias de exposição ao solo contaminado com lixiviado	69
Figura 24 - Curva dose-resposta do ensaio definitivo de letalidade em minhocas <i>Eisenia andrei</i> após 72 h, 7 e 14 dias de exposição ao solo contaminado com lixiviado	70
Figura 25 - Variação nos valores pH do solo no ensaio definitivo de letalidade	71
Figura 26 - Perda de biomassa das minhocas <i>Eisenia andrei</i> após os 14 dias do ensaio de letalidade	71
Figura 27 - Efeito do solo contaminado com lixiviado sobre os organismos nos tratamentos (a) T2 e (b) T3.....	73
Figura 28 - Efeito do solo contaminado com lixiviado sobre os organismos no tratamento T4	73
Figura 29 - Efeito do solo contaminado com lixiviado sobre os organismos no tratamento T5	74
Figura 30 - Peso médio dos organismos exposto a recontaminação.....	76
Figura 31- Variação do pH do solo no ensaio de recontaminação	77
Figura 32 - Efeitos físicos causados ao corpo das minhocas <i>Eisenia andrei</i> : (a e c) início da automutilação e (b) após fragmentação do corpo.....	80
Figura 33 - Percentuais de fuga dos organismos em solo contaminado com lixiviado.	81

Figura 34 - Crescimento médio das raízes das sementes exposta a amostra A2 de lixiviado..	83
Figura 35 - Crescimento médio das raízes das sementes exposta a amostra A3 de lixiviado..	86
Figura 36 - CRR das sementes do tomate, repolho e alface.....	89
Figura 37 - GRS média para as amostras (a) A2 e (b) A3.	91
Figura 38 - GRS média para as amostras (a) A2 e (b) A3	93
Figura 39 - Curva dose-resposta do crescimento das sementes de tomate (a), repolho (b) e alface (c) da amostra A2.....	95
Figura 40 - Curva dose-resposta do crescimento das sementes de tomate (a), repolho (b) e alface (c) da amostra A3.....	95
Figura 41 - Comparativo do crescimento médio das raízes entre o lixiviado fresco e o preservado para a semente de tomate.....	96
Figura 42 - Comparativo do crescimento médio das raízes entre o lixiviado fresco e o preservado para a semente de repolho	97

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Normas vigentes da ecotoxicologia terrestre no Brasil	28
Quadro 2 - Estudos publicados que utilizam minhocas para avaliação de contaminantes	34
Quadro 3 - Espécies utilizadas para avaliação de toxicidade em lixiviado de aterro sanitário	36
Quadro 4 - Indicadores e métodos utilizados para a caracterização do lixiviado.....	41
Quadro 5 - Classificação do grau de fitotoxicidade.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Exemplos de estudos que avaliaram a toxicidade de lixiviado de aterro sanitário em diferentes organismos-teste	31
Tabela 2 - Proporções ideais dos insumos que compõe o alimento de criação	46
Tabela 3 - Ajuste do pH do SAT	50
Tabela 4 - Quantidade de organismos utilizados no ensaio de recontaminação	56
Tabela 5 – Concentrações dos indicadores físico-químicos e teores de metais do lixiviado do ASCG	61
Tabela 6 - Letalidade do ensaio preliminar em minhocas <i>Eisenia andrei</i> expostas ao solo contaminado com lixiviado	64
Tabela 7 - Características observadas nas minhocas <i>Eisenia andrei</i> durante e após o ensaio preliminar de letalidade	66
Tabela 8 - Letalidade do ensaio definitivo em minhocas <i>Eisenia andrei</i> expostas ao solo contaminado com lixiviado	68
Tabela 9 - Valores do pH do solo no ensaio definitivo de letalidade	70
Tabela 10 - Valores dos p-valores obtidos pelo teste ANOVA quando comparado os pesos dos indivíduos antes e após o ensaio definitivo de letalidade	72
Tabela 11 - Características observadas nas minhocas <i>Eisenia andrei</i> durante e após o ensaio definitivo de letalidade	72
Tabela 12 - Peso médio dos organismos expostos ao ensaio de recontaminação	74
Tabela 13 - Valores do pH do solo no ensaio de recontaminação	77
Tabela 14 - Letalidade do ensaio de recontaminação em minhocas <i>Eisenia andrei</i> expostas ao solo contaminado com lixiviado	78
Tabela 15 - Características observadas nas minhocas <i>Eisenia andrei</i> durante e após o ensaio de recontaminação	79
Tabela 16 - Percentuais médio de fuga dos organismos em solo contaminado com lixiviado	81
Tabela 17 - Valores do CRR das sementes estudadas para as amostras de lixiviado	88
Tabela 18 - Germinação relativa da semente das sementes de tomate, repolho e alface para as amostras A2 e A3	90
Tabela 19 - Índice de germinação das sementes de tomate, repolho e alface para as amostras A2 e A3	92
Tabela 20 - Valores da CE ₅₀ das sementes de tomate, repolho e alface para as amostras A2 e A3	94
Tabela 21 - Valores da CE ₅₀ das amostras preservadas e frescas	97
Tabela 22 - Valores da CE e CL dos organismos	98

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E NOMENCLATURAS

A1	Amostra 1 de lixiviado <i>in natura</i>
A2	Amostra 2 de lixiviado <i>in natura</i>
A3	Amostra 1 de lixiviado <i>in natura</i>
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANOVA	Análise de variância
ASCG	Aterro Sanitário em Campina Grande – Paraíba
Al	Alumínio
AT	Alcalinidade Total
Ca	Cálcio
CaCO ₃	Carbonato de cálcio
CaCl ₂	Cloreto de Cálcio
CE	Concentração efetiva
CENO	Concentração de Efeito não Observado
CEO	Concentração de Efeito Observado
CH ₃ COOH	Ácido acético
CI	Concentração ideal
Cl ⁻	Cloreto
CL	Concentração letal
Cm	centímetros
CO ₂	Dióxido de Carbono
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
COT	Carbono Orgânico Total
Cr	Cromo
CRAm	Comprimento da Raiz da Amostra
CRA	Capacidade de retenção de água do solo
CRC	Comprimento da Raiz do Controle
CRR	Crescimento Relativo da Raiz
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DQO	Demanda Química de Oxigênio
EDL	Ensaio Definitivo de Letalidade
F	Fuga

Fe	Ferro
Fibra CC	Fibra da casca de coco
FO	Fuga observada
g	grama
GGA	Grupo de Pesquisa de Geotecnia Ambiental
GRS	Germinação Relativa das Sementes
h	horas
H ₂	Gás hidrogênio
IG	Índice de Germinação
ISO	Organização Internacional de Normalização
ITEP	Instituto Tecnológico de Pernambuco
L	litro
LQA	Laboratório de Química Analítica
LGA I	Laboratório de Geotecnia Ambiental
LGAB II	Laboratório de Geotecnia Ambiental e Biotecnologia
L1	Lagoa de acúmulo e evaporação de lixiviado 1
L2	Lagoa de acúmulo e evaporação de lixiviado 2
L3	Lagoa de acúmulo e evaporação de lixiviado 3.
L4	Lagoa de acúmulo e evaporação de lixiviado 4
M	metro
m ³ .dia ⁻¹	metro cúbico por dia
mg	miligrama
Mg	Magnésio
mg.L ⁻¹	Miligrama por litro
min	minuto
mL.kg ⁻¹	Mililitro por quilograma de massa seca
mm	milímetros
Mn	Manganês
N	número total de minhocas
NA	Não analisada
NAT	Nitrogênio Amoniacal Total
NBR	Norma brasileira
n _c	número de minhocas no solo controle

NF	Fuga não observada
NH ₃	amônia livre ou gasosa
NH ₄	íon amônico
NO	Efeito não observado
n _t	número de minhocas no solo-teste
O ₂	Oxigênio
OECD	Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico
PEAD	Geomembrana de Polietileno de Alta Densidade
Pb	Chumbo
PDH	Perda de habitat
pH	Potencial Hidrogeniônico
PS	peso seco da amostra
PU	peso úmida da amostra
SAT	Solo Artificial Tropical
SGA	Germinada nas Amostras
SGC	Sementes Germinadas no Controle
ST	Sólidos Totais
SVT	Sólidos Voláteis Totais
REC	Ensaio de recontaminação
RSU	Resíduos Sólidos Urbanos
TNT	Tecido Não Tramado
t RSU.dia ⁻¹	Tonelada de resíduos sólidos urbanos depositados por dia
U	Umidade
UFMG	Universidade Federal de Campina Grande
USEPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos
UTM	Universal Transversa de Mercator
v/v	volume por volume
v/p	volume por peso
Zn	Zinco
°C	grau Celsius

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	OBJETIVOS	22
2.1	Geral	22
2.2	Específicos	22
3	REFERENCIAL TEÓRICO	23
3.1	Lixiviado de aterro sanitário	23
3.1.1	Impactos do lixiviado no meio ambiente e na saúde pública	25
3.2	Ecotoxicologia	26
3.2.1	Avaliação ecotoxicológica	29
3.3	Ensaio ecotoxicológico com minhocas	33
3.4	Fitotoxicidade	35
4	METODOLOGIA	38
4.1	Área de estudo	38
4.2	Etapas metodológicas	39
4.3	Coleta e caracterização do lixiviado	40
4.4	Ensaio ecotoxicológicos com minhocas	41
4.4.1	Organismos-teste	41
4.4.2	Criação e manutenção dos organismos	42
4.4.2.1	Alimento de criação	44
4.4.2.2	Correção do pH	45
4.4.2.3	Umidade do alimento	46
4.4.2.4	Teste de aceitação do alimento	48
4.4.2.5	Realimentação	48
4.4.3	Substrato-teste	49
4.4.4	Ensaio de letalidade	51
4.4.4.1	Ensaio preliminar de letalidade	53
4.4.4.2	Ensaio definitivo de letalidade	54
4.4.4.3	Ensaio de recontaminação	55
4.4.5	Ensaio comportamental de fuga	56
4.5	Teste de fitotoxicidade	58
4.6	Análise estatística	59
5	RESULTADOS	61

5.1 Característica do lixiviado	61
5.2 Ensaios ecotoxicológicos com minhocas	64
5.2.1 Ensaio de letalidade preliminar	64
5.2.2 Ensaio de letalidade definitivo	68
5.2.3 Ensaio de recontaminação	74
5.2.4 Ensaio comportamental de fuga	80
5.3 Teste de fitotoxicidade	83
5.3.1 Crescimento das raízes.....	83
5.3.2 Crescimento relativo da raiz.....	87
5.3.3 Germinação relativa da semente.....	90
5.3.4 Índice de germinação	92
5.3.5 Concentração efetiva de inibição do crescimento	94
5.3.6 Comparação entre o lixiviado fresco e preservado.....	96
5.4 Sensibilidade dos organismos-teste	98
6 CONCLUSÕES	99
7 REFERÊNCIAS	100

1 INTRODUÇÃO

O lixiviado, subproduto líquido gerado da biodegradação dos Resíduos Sólidos Urbanos (RSU), tem sido uma das preocupações no gerenciamento de aterros, pois sua composição contém substâncias químicas, tóxicas e multanogênicas, que quando em contato com o meio ambiente pode contaminar o solo e os recursos hídricos, que, conseqüentemente, afetam a saúde humana (MASONER *et al.*, 2016).

Atualmente, a avaliação do potencial impacto do lixiviado no ecossistema, concentram-se na identificação dos contaminantes responsáveis pela toxicidade, no entanto, identificá-los, é uma tarefa difícil em virtude da variedade de produtos químicos, do número limitado de parâmetros químicos que são rotineiramente analisados e da complexidade e diversidade de cada lixiviado. Além disso, as análises tradicionais (físico-químicas), não fornecem dados suficientes para avaliar os riscos, especialmente, no que diz respeito aos organismos vivos (BUDI *et al.*, 2016).

Desta forma, para suprir essa lacuna, tem-se empregado análises complementares, em que se utilizam bioensaios como bioindicadores para avaliar a ecotoxicidade de lixiviado. De acordo com Zagatto (2014), os testes ecotoxicológicos (bioensaios) fornecem informações mais precisas do real impacto do efluente no meio ambiente, devido avaliarem os efeitos do contaminante em organismos-teste.

A avaliação ecotoxicológica de efluentes, comumente, utiliza organismos aquáticos ou plantas, e de acordo com Sisino *et al.* (2019a) a pouca utilização de organismos terrestres, ocorre, principalmente, pela falta de demanda legal, pois as legislações ambientais vigentes no Brasil (Resolução CONAMA nº430/2011) sugerem que na avaliação ecotoxicológica de efluentes se utilizem organismos aquáticos de pelos menos dois níveis tróficos. Sendo assim, os impactos causados as plantas e aos outros organismos do solo são desconsiderados.

A utilização de testes ecotoxicológicos, com lixiviado de aterro sanitário, tem sido bastante enfatizada, sendo eles geralmente empregados para avaliar a redução da toxicidade após o tratamento do efluente, para que assim possa ser lançado no meio ambiente. No entanto, avaliar os efeitos do lixiviado *in natura*, sem tratamento, em organismos-teste é algo que deve ser investigado, pois, embora o efluente seja monitorado, casos de contaminação no solo e nos recursos hídricos tem sido retratada frequentemente pela literatura. Sendo assim, investigar a ecotoxicidade do lixiviado deve contemplar, também, o uso dos organismos terrestres, pois, em caso de vazamento, antes de atingir os recursos hídricos ocorre a contaminação do solo, que pode acumular poluentes e causar danos ao ecossistema (VAVERKOVÁ *et al.*, 2018).

Dentre os organismos terrestres, as minhocas são consideradas bioindicadores da qualidade do solo, pois suas características morfológicas e fisiológicas as tornam suscetíveis aos agentes químicos presentes no substrato (SILVA JÚNIOR *et al.*, 2019). As minhocas exercem funções extremamente complexas na manutenção do solo, sendo ainda consideradas organismos-chave, pois garantem a aeração desse ambiente e a disponibilidade de minerais importantes para plantas e microrganismos que ali subsistem (LACKMANN *et al.*, 2018). Por esse motivo, é necessário avaliar os efeitos de poluentes de diversos ambientes causados a esses organismos.

Destaca-se, ao mesmo tempo, que para a avaliação ecotoxicológica de solo também tem se utilizado, frequentemente, sementes de plantas como bioindicadores, que apresentam maior aplicabilidade devido ao teste ser sensível e simples de ser realizado (PRIAC, BADOT e CRINI, 2017), além de apresentar baixo custo comparado a outros testes empregados. Como exemplo dessa aplicabilidade, tem-se os estudos desenvolvidos por Gomes *et al.* (2018) e Colombo *et al.* (2019) que utilizaram sementes para avaliar a toxicidade de lixiviado em aterros sanitários brasileiros.

Então, considerando que o lixiviado pode contaminar o solo de aterros sanitários, bem como os das áreas adjacentes ao empreendimento, ocasionada, principalmente, pela migração do líquido para as camadas mais profundas do substrato, torna-se importante entender como a toxicidade desse efluente afeta os organismos terrestres.

Deste modo, a utilização de organismos terrestres, de pelo menos dois níveis tróficos, como as minhocas representando os decompositores e as sementes representando os produtores primários, melhor avalia a ecotoxicidade do lixiviado de aterros sanitários, visto que, organismos de espécies diferentes também apresentam sensibilidades diferentes. Além disso, os resultados dos testes ecotoxicológicos podem dar subsídios aos órgãos ambientais na formulação de resoluções que implementem os bioensaios como ferramenta legal no monitoramento ambiental de lixiviado de aterros, pois esse efluente é complexo, as análises de caracterização físico-química não retratam os dados causados ao meio ambiente e suas características ecotoxicológicas são pouco compreendidas.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Determinar a ecotoxicidade de lixiviado *in natura* de aterro sanitário utilizando minhocas da espécie *Eisenia andrei* e sementes de *Solanum lycopersicum*, *Lactuca sativa* e *Brassica oleracea* como organismos-teste.

2.2 Específicos

- ✓ Quantificar as concentrações letais e os efeitos adversos causados em minhocas *Eisenia andrei* sob ação tóxica de solo contaminado com lixiviado;
- ✓ Mensurar o efeito de fuga das minhocas *Eisenia andrei* sob ação tóxica de solo contaminado com lixiviado;
- ✓ Determinar a fitotoxicidade do lixiviado em sementes *Solanum lycopersicum*, *Lactuca sativa* e *Brassica oleracea*.
- ✓ Comparar a fitotoxicidade do lixiviado fresco e preservado utilizando sementes *Solanum lycopersicum* e *Lactuca sativa*;
- ✓ Avaliar a sensibilidade dos diferentes organismos quando expostos ao lixiviado de aterro sanitário.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Lixiviado de aterro sanitário

O lixiviado de aterros sanitários é um efluente líquido resultante da decomposição dos resíduos sólidos aliado à percolação de águas pelas camadas de cobertura do aterro (PENG, 2017). Esse efluente possui elevada complexidade constituído por matéria orgânica dissolvida, componentes macro inorgânicos, metais e compostos orgânicos xenobióticos (CANTO *et al.*, 2013; COSTA, ALFAIA e CAMPOS, 2019). Tal composição torna o lixiviado um dos maiores problemas associados à operação de aterros devido à dificuldade no desenvolvimento de tecnologias de proteção ambiental (ZIYANG *et al.*, 2009).

A variabilidade do lixiviado é influenciada por diferentes fatores como: climáticos (precipitação, evaporação, temperatura); operacionais e estruturais do aterro (altura do talude, grau de compactação dos resíduos, idade do aterro); e características dos resíduos aterrados, como a umidade e a composição, que podem interferir nos processos de biodegradação, no volume de lixiviado gerado e na sua carga de poluição (ŽALTAUSKAITĖ e VAITONYTE, 2017; NAVEEN *et al.*, 2017).

De acordo com Tchobanoglous, Thiesen e Vigil (1993) a biodegradação dos resíduos sólidos ocorre em cinco fases distintas, as quais influenciarão direta ou indiretamente na composição do lixiviado, em virtude da predominância dos compostos gerados em cada etapa. Assim, essas fases são divididas em:

A Fase I - Aeróbia, corresponde a decomposição biológica da fração rapidamente biodegradável sob condições de aerobiose, ou seja, na presença de oxigênio (O_2), quando dispostos os resíduos sólidos no aterro sanitário. Essa fase dura poucos dias devido à redução de oxigênio no meio. A principal fonte de microrganismos provém do solo, empregado na camada de cobertura a cada jornada de trabalho e também da recirculação do lixiviado.

A Fase II – Transição, inicia quando o oxigênio (O_2) existente nas porosidades se esgota, por consumo dos microrganismos, ou foi expulso dos vazios por meio do processo de compressão, dando início com isso, a fase anaeróbia. Embora seja de curta duração é no decorrer da biodegradação, nessa etapa, que ocorre grande liberação de calor, e o lixiviado gerado apresentarão elevadas concentrações de sais de alta solubilidade dissolvidos no líquido resultante.

Os microrganismos característicos desta fase são responsáveis pela conversão do material orgânico complexo em ácidos orgânicos e outros produtos intermediários. Vale

destacar que, as elevadas concentrações de dióxido de carbono (CO₂) e a presença de grandes quantidades de ácidos orgânicos, característicos desta fase, influem no decaimento do pH.

Na fase III- Ácida, corresponde a conversão biológica dos compostos, resultantes na fase anterior, em compostos como principalmente, o ácido acético (CH₃COOH) e CO₂. O pH do meio tende a ser baixo, nessa etapa de decomposição, assim, o caráter ácido do lixiviado pode contribuir na solubilização de materiais inorgânicos, podendo apresentar altas concentrações de ferro (Fe), manganês (Mn), zinco (Zn), cálcio (Ca) e magnésio (Mg). A Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) e a Demanda Química de Oxigênio (DQO) tendem a aumentar consideravelmente durante esse período devido à dissolução dos ácidos orgânicos produzidos.

Na fase IV- Metanogênica, característica da conversão de ácido acético e gás hidrogênio (H₂) em metano e dióxido de carbono, diminuindo consideravelmente a geração de ácidos, que refletem diretamente em acréscimo, nas medidas, do pH enquanto que, as concentrações de DBO e DQO são reduzidas ao longo do tempo. As concentrações de metais no lixiviado também são reduzidas em consequência da diminuição de compostos inorgânicos dissolvidos.

A fase V- Maturação, como uma grande parte dos nutrientes foram consumidos durante a geração do lixiviado há predominância, nesta etapa, de compostos recalcitrantes, ou seja, de difícil degradação. O pH do efluente atinge valores alcalinos enquanto que, as concentrações de DBO e DQO reduzem drasticamente devido à estabilização da atividade biológica.

Embora a biodegradação ocorra em diferentes etapas há inter-relações entre essas a fim de garantir o processo degradativo, uma vez que, os substratos fornecidos de uma fase é o produto principal para a etapa subsequente. Porém, apesar dessa divisão facilitar o entendimento dos fenômenos de estabilização biológica dos resíduos, efetivamente em um aterro sanitário, essas fases podem não acontecer de forma sequenciada e bem definida, devido à disposição contínua de resíduos novos, causando diferença na idade dos compostos, das condições físico-químicas e biológicas dos resíduos. Assim, as etapas de biodegradação podem ocorrer de forma simultânea, influenciando dessa forma, em um lixiviado com características distintas ao longo da vida útil do aterro (VAVLIN *et al.*, 2003; CASTILHOS Jr. *et al.*, 2003).

Além da biodegradação, outro fator importante na influência da composição do lixiviado refere-se aos fatores climáticos. Ghiasinejad *et al.* (2021) observaram que aterros localizados em regiões áridas e semiáridas tendem a gerar menos volume de lixiviado, em virtude das chuvas escassas e mal distribuídas com longos períodos de estiagem, porém o efluente gerado apresenta maiores concentrações de contaminantes, resultando em uma maior

carga poluidora para o ambiente. Condições semelhantes foram observadas por Abunama, Tengku Nilam e Othman (2021) ao relatarem, em estudo realizado em aterro sanitário localizado no semiárido da Palestina, que o lixiviado gerado, sob essa condição de clima, apresentam potenciais de poluição maiores que os aterros localizados em clima úmido, devido aos baixos níveis de chuva da região, que, conseqüentemente, não causam a diluição dos poluentes, tornando-os mais concentrado.

Cabe acrescentar que a toxicidade do lixiviado está relacionada a sua composição, portanto, a busca pela identificação dos principais poluentes contidos no lixiviado decorre, principalmente, da necessidade de avaliar seu potencial tóxico e os efeitos significativos que possam ser causados ao meio ambiente. Geralmente, essa identificação é feita por meio de análises físico-químicas as quais se determinam, por exemplo, os valores de: pH, demanda química de oxigênio (DQO), demanda bioquímica de oxigênio (DBO), sólidos totais (ST), nitrogênio amoniacal total (NAT), cloreto, e metais (Cr, Zn, Fe, Pb, Al, Mn).

De acordo Gomes *et al.* (2018), a toxicidade do lixiviado está associada, principalmente, aos elevados teores de metais e o NAT. Além desses, Pablos *et al.* (2011) associou a toxicidade a outros elementos, sendo eles a DQO, Alcalinidade Total (AT) e cloretos, uma vez que, amostras contendo elevadas concentrações desses elementos causaram efeitos significativos em organismos-teste.

Portanto, em virtude da influência de vários fatores que alteram a composição do lixiviado, então, determinar os principais poluentes que elevam sua toxicidade é essencial para estimar seu potencial de poluição, visto que as altas concentrações podem aumentar os efeitos tóxicos principalmente nos recursos naturais (GHOSH *et al.*, 2017).

3.1.1 Impactos do lixiviado no meio ambiente e na saúde pública

Os impactos ambientais causados pelo lixiviado, comumente, ocorrem por vazamento do efluente armazenado em tanques de estocagem ou através da infiltração pela camada de base do aterro (GUPTA e PAULRAJ, 2017; VAVERKOVÁ *et al.*, 2019). A literatura retrata vários casos de contaminação de metais causada por lixiviado de aterro sanitário em água subterrânea, solo e plantas (ABD EL-SALAM *et al.*, 2015; MONDELLI, *et al.*, 2016; ALAM, AHMED & HOWLADAR, 2020). Os metais são poluentes bioacumuláveis, desta forma, sua disposição em solo reflete efeitos significativos em organismos terrestres, a exemplos das minhocas (WANG *et al.*, 2018) e das plantas (ZWOLAK *et al.*, 2019), que podem absorver e acumular metais pesados.

Embora seja mais abordada a contaminação causada por metais, Negi, Mor e Ravindra (2018) verificaram elevadas concentrações de NAT, DQO e Cloretos em águas subterrâneas localizadas em áreas do entorno de aterro, assim como, Makarenko e Budak (2017) também identificaram excessivas concentrações de NAT, DBO e ferro (Fe) na água resultante do escoamento superficial das células de aterro sanitário. Cabe acrescentar que a amônia livre (NH₃), um dos componentes do NAT, é um elemento tóxico para a biota aquática, então, elevadas concentrações podem ocasionar a intoxicação de espécies de peixes e até a mortandade (ZHANG *et al.*, 2018).

Diante as contaminações ocorridas em áreas do entorno do aterro, para Alimba *et al.*, (2016) os solos de aterros sanitários são sumidouros finais de resíduos químicos capazes de aumentar a poluição aquática e terrestre, principalmente, ocasionada pela lixiviação de substâncias.

Além dos efeitos no ecossistema, o desequilíbrio ocasionado pela contaminação dos recursos naturais refletem diretamente na saúde e bem-estar humano. De acordo com Mukherjee *et al.* (2015) os poluentes contidos no lixiviado de aterros sanitários têm efeito acumulativo e prejudicial à ecologia e às cadeias alimentares, levando a efeitos carcinogênicos, toxicidade aguda e genotoxicidade entre os seres humanos. Sobre os efeitos que afetam a qualidade de vida, Alghamdi, Aly e Ibrahim (2021) verificaram que as águas subterrâneas nas proximidades de aterro sanitário apresentaram elevada salinidade e concentrações de metais, tornando-as impróprias para a irrigação e para o consumo humano e animal. Sendo assim, o lixiviado não deve ser lançado no meio ambiente sem o devido tratamento, pois os danos causados aos ecossistemas podem ser irreversíveis. Cabe acrescentar, que os aterros sanitários brasileiros, de acordo com Costa, Alfaia e Campos (2019), apresentam baixas concentrações de metais, comportamento esse, possivelmente associado a baixa solubilidade dos metais em pH alcalinos. Apesar disso, outras substâncias químicas, em elevadas concentrações foram encontradas pelos autores, como o nitrogênio amoniacal, que podem afetar o equilíbrio ecossistêmico.

3.2 Ecotoxicologia

O termo ecotoxicologia foi sugerido pela primeira vez em 1969 pelo Professor René Truhaut, o qual a definiu como a ciência que descreve os efeitos de vários agentes em organismos vivos (Connel *et al.*, 1999). Segundo relato de Zagatto (2014), em 1976 essa ciência foi definida por Plaa (1982) como sendo a ciência que estuda os efeitos das substâncias naturais

ou sintética sobre organismos vivos, populações e comunidades, animais ou vegetais, terrestres ou aquáticos, que constituem a biosfera, incluindo a interseção das substâncias com o meio nos quais os organismos vivem num ambiente integrado.

Para Zagatto (2014) definir a ecotoxicologia requer uma visão mais ampla do que uma simples avaliação de efeitos das substâncias sobre os organismos, pois a toxicidade pode não ser o resultado da ação de apenas uma substância isolada, mas da interação e magnitude de vários agentes presentes em um determinado ambiente.

Em se tratando da contaminação dos compartimentos do solo a atuação da ecotoxicologia tem sido a ecotoxicologia terrestre, a qual avalia os efeitos de substâncias tóxicas em organismos presentes no solo. Essa subárea tem se destacando como uma importante ferramenta de avaliação de risco (BARETTA *et al.*, 2019), porém a ausência de legislação específica dificulta a propagação desses estudos.

Os instrumentos legais para a efetividade da ecotoxicologia ainda são pouco difundidos no Brasil. Atualmente, os instrumentos legais que sugerem a utilização de ensaios ecotoxicológicos para a avaliação do potencial tóxico de efluentes, concentram-se em atender os requisitos da Resolução CONAMA nº 430/2011 (BRASIL, 2011), a qual trata das condições e padrões de lançamento de efluentes em corpos de água receptores.

Segundo o Art. 18 da Resolução CONAMA nº 430/2011 (BRASIL, 2011) o efluente não deverá causar ou possuir potencial para causar efeitos tóxicos aos organismos aquáticos no corpo receptor, de acordo com os critérios de ecotoxicidade estabelecidos pelo órgão ambiental competente. Além disso, em seu § 1º dispõe que os critérios de ecotoxicidade previstos no caput do Art. 18 devem se basear em resultados de ensaios ecotoxicológicos aceitos pelo órgão ambiental, realizados no efluente e utilizando organismos aquáticos de pelo menos dois níveis tróficos.

Apesar da existência desse instrumento nacional, poucos são os estados que possuem resoluções que abordem os critérios ecotoxicológicos para a avaliação de efluentes, a exemplo dos estados de São Paulo (Resolução SMA nº 03/2000), Paraná (Resolução CEMA nº 81/2010), Rio de Janeiro (Norma Operacional Padrão INEA – 008/ 2018) e Santa Catarina (Portaria FATMA Nº 017/ 2002). No entanto, cabe acrescentar, que a avaliação ecotoxicológica abordada pelas resoluções estaduais e a nacional, antes mencionadas, utilizam organismos aquáticos, logo, consideram apenas seus efeitos na biota aquática, porém, os organismos do solo também estão sujeitos diretamente a esse tipo de contaminação.

Em relação a legislação ambiental que assegura a qualidade do ecossistema edáfico, tem-se a resolução CONAMA nº 420/2009 (BRASIL, 2009), que dispõe de critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas. Apesar dessa resolução fazer referência aos limites máximos permissíveis para que não haja risco de contaminação do solo, não é enfatizado a avaliação ecotoxicológica. Embora seu Art. 9º expõe que os valores de prevenção devem ser embasados em ensaios de fitotoxicidade, a resolução não especifica os critérios que devem ser considerados para a realização do ensaio, o que a torna limitada e vaga. Além disso, essa resolução não orienta a utilização de outros tipos de organismos na avaliação ecotoxicológica do solo.

De acordo com Lisbôa *et al.* (2021) a legislação ambiental brasileira voltada para a qualidade do solo precisa ser revisada e deve incluir ensaios ecotoxicológicos, pois as análises físicas e químicas do solo têm se tornado insuficientes para avaliar sua qualidade, sendo necessário implementar uma abordagem ecotoxicológica.

Quanto as normas para ensaios ecotoxicológicos terrestres no Brasil, tem-se observado pontos positivos, pois atualmente existem sete normas vigentes, como mostradas no Quadro 1.

Quadro 1- Normas vigentes da ecotoxicologia terrestre no Brasil

Agência	Norma	Descrição
ABNT	NBR ISO: 17616: 2010	Qualidade do solo - Guia para a seleção e avaliação de bioensaios para a caracterização ecotoxicológica de solos e materiais do solo.
ABNT	NBR ISO: 17512-1: 2011	Qualidade do solo - Ensaio e fuga para avaliar a qualidade de solos e efeitos de substâncias químicas no comportamento.
ABNT	NBR ISO 11267: 2011	Qualidade do solo - Inibição da reprodução de Collembola (<i>Folsomia candida</i>) por poluentes do solo
ABNT	NBR ISO 15799: 2011	Qualidade do solo - Guia para caracterização ecotoxicológica de solos e materiais do solo
ABNT	NBR ISO 16387: 2012	Qualidade do solo -Efeitos de poluentes em Enchytraeidae (<i>Enchytraeus sp.</i>) - Determinação de efeitos sobre reprodução e sobrevivência.
ABNT	NBR 15537: 2014	Ecotoxicologia terrestre - Ecotoxicidade aguda - Método de ensaio com minhocas
ABNT	NBR ISO 11269-2: 2014	Qualidade do solo - Determinação dos efeitos de poluentes na flora terrestre.

Fonte: Adaptado de Sisinno, Sautter e Niva (2019b).

3.2.1 Avaliação ecotoxicológica

A avaliação ecotoxicológica tem sido utilizada como uma ferramenta complementar para melhor caracterizar a toxicidade de efluentes (MAVAKALA *et al.*, 2016; PRIAC, BADOT e CRINI, 2017) e de solos contaminados (ENUNEKU, BIOSE e EZEMONYE, 2017), pois, utilizam organismos como bioindicadores. De acordo com Parmar, Rawtani e Agrawal (2016), os bioindicadores são organismos vivos como plantas, plânctons, animais e micróbios que são utilizados para avaliar a saúde do ecossistema, devido fornecerem indicações de perturbações ambientais ocasionadas, principalmente, por contaminação. Então, em decorrência das atividades antrópicas gerarem efluentes com composição cada vez mais complexas, para Zagatto (2014), as análises físico-químicas tradicionais têm se tornado insuficientes para avaliar sua toxicidade, pois não retratam o real impacto ambiental e seus efeitos sobre o ecossistema, sendo necessário, realizar ensaios ecotoxicológicos.

A abordagem dos ensaios ecotoxicológicos, podem seguir duas vertentes, a avaliação prospectiva ou a retrospectiva (FILSER *et al.*, 2008). A avaliação prospectiva estima o risco potencial de substâncias químicas nos organismos a partir da contaminação em laboratório de seus habitats, ou seja, simula-se o um ambiente contaminado e avalia-se seus efeitos. Já a avaliação retrospectiva, avalia-se o risco potencial de ambientes já contaminados, em que os organismos são expostos a amostras de solo ou corpos d'água contaminados e os efeitos observados são comparado com ambientes sem contaminação. Essa última abordagem tem sido bastante utilizada em estudos de avaliação de áreas que passaram por processo de descontaminação.

A escolha dos organismos-teste (bioindicadores) é feita de acordo o objetivo do estudo, contudo, segundo Domingues e Bertoletti (2014) três critérios devem ser considerados: o primeiro, a sensibilidade dos organismos, pois é preciso que a espécie seja sensível a uma diversidade de agentes químicos; o segundo critério é a disponibilidade dos organismos, em que se deve dá prioridade a organismos que possam ser cultivados em laboratório e que sejam facilmente adquiridos; e o terceiro é utilizar espécies autóctones ou representativas do ecossistema em estudo, ou seja, a espécie deve exercer papel importante no que se refere à estrutura e funcionamento das biocenoses.

Cabe acrescentar que os organismos possuem pequeno limite de tolerância ecológica a determinadas substâncias químicas, então, quando expostos a misturas complexas, efluentes líquidos ou amostras ambientais é possível observar os efeitos na sobrevivência, como também alterações morfológicas, fisiológicas e comportamentais (BARSZCZ *et al.*, 2019).

Os ensaios ecotoxicológicos podem ser de curta duração (toxicidade aguda) ou de longa duração (toxicidade crônica). O ensaio de toxicidade aguda avalia-se as respostas rápidas dadas pelo organismo em um curto período de tempo, de 0 a 96 horas, em que são observadas a letalidade ou a imobilidade dos organismos-teste, além disso, podem ser observadas as alterações ocorridas imediatamente após a exposição dos organismos ao agente químico. Enquanto que, no ensaio de toxicidade crônica, os organismos são submetidos a uma exposição contínua ao agente tóxico em doses subletais durante um longo período de tempo, em que são avaliadas mudanças: no metabolismo, morfológicas, crescimento, reprodução, mutações genéticas e até mesmo a mortalidade (BARETTA *et al.*, 2019).

Os resultados dos ensaios ecotoxicológicos, em geral, são analisados por estimativas de ponto, em que são expressos como concentrações letais (CL_x) e efetivas (CE_x) que causam respectivamente a mortalidade e a anormalidade ou inibição dos organismos expostos ao contaminante (NASCIMENTO, PEREIRA e LEITE, 2014). Os valores da CL_x e EC_x correspondem a concentração que dá $x\%$ do efeito máximo do componente tóxico ou em que $x\%$ da população exibe uma resposta, após a exposição especificada (BUDI *et al.*, 2016). Deste modo, quanto menor o valor da CE_x ou CL_x mais tóxico é o contaminante.

Embora os ensaios ecotoxicológicos sejam excelentes para o diagnóstico da qualidade ambiental e de controle da poluição, de acordo com Aragão e Araújo (2014) os seus resultados não podem ser extrapolados para o homem, da mesma forma em que não se pode extrapolar os efeitos de organismos aquáticos com organismos do solo, pois os organismos têm sensibilidades diferentes quando expostos ao mesmo contaminante.

Com a evolução dos estudos ecotoxicológicos, juntamente com as publicações de Normas Internacionais e Nacionais que padronizam esses ensaios, a investigação da toxicidade de efluentes de grande complexidade, como o lixiviado, tem se tornado mais frequente. A toxicidade do lixiviado estudadas por vários autores estão expostas na Tabela 1, os quais utilizaram organismos de diferentes níveis tróficos dentre eles bactérias, algas/ plantas, invertebrados e vertebrados.

Tabela 1 - Exemplos de estudos que avaliaram a toxicidade de lixiviado de aterro sanitário em diferentes organismos-teste

Organismos	Grupo de organismo/ planta	Parâmetro avaliado	Referência
Bactéria			
<i>Vibrio fischeri</i>	Bactéria marinha	EC ₅₀ (%)	0,62 – 24,34
<i>Aliivibrio fischeri</i>			Aydin <i>et al.</i> (2015)
<i>Aliivibrio fisheri</i>			13,0 – 33,0
<i>Aliivibrio fischeri</i>			8,4 ± 3,9
<i>Aliivibrio fischeri</i>			< 12
			Restrepo <i>et al.</i> (2017)
Algas / Planta			
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	Microalga	EC ₅₀ (%)	9,3 – 42,5
<i>Lemna minor</i>	Planta aquática		1,92 – 4,83
<i>Lepidium sativum</i>	Planta herbácea		0,62 - 4.60
			Tsarpali, Kamilari e Dailianis (2012)
			Aydin <i>et al.</i> (2015)
Vertebrados			
<i>Anabas Testudineus</i>	Peixe	CL ₅₀ (%)	4,7 - 5,1
<i>Brachydanio rerio</i>	Peixe		2,35
<i>Daniorerio</i>			5,7 ± 1,7
			Fauziah, Izzati e Agamuthu (2013)
			Franco <i>et al.</i> (2018)
			Souza <i>et al.</i> (2019)
Invertebrados			
<i>Artemia franciscana</i>	Custáceo	CL ₅₀ (%)	54,64 – 95,24
<i>Thamnocephalus platyurus</i>	Camarão		2,56 – 9,06
<i>Brachionus plicatilis</i>	Rotífero		30,98 – 92,95
			Tsarpali, Kamilari e Dailianis (2012)
<i>Daphnia magna</i>	Microcrustáceo		< 1
<i>Daphniasimilis</i>			13 ± 4,8
			Restrepo <i>et al.</i> (2017)
			Souza <i>et al.</i> (2019)

Fonte: Autora (2021).

Diante dos estudos mencionados na Tabela 1, nota-se que as concentrações letais e as efetivas, apresentam faixas de toxicidade variadas, mesmo nos estudos que utilizaram espécies iguais de organismos. O estudo de Costa *et al.* (2018), por exemplo, avaliou a toxicidade de dois aterros sanitários brasileiros, um em operação e um outro encerrado, no estado do Rio de Janeiro, utilizando a bactéria *Aliivibrio fischeri*. Os autores identificaram que no aterro em operação a CE₅₀ foi de 33% e no aterro encerrado foi de 13%, sendo esse último mais tóxico ao organismo-teste. Como já discutido na subseção 3.1 o lixiviado apresenta composição variada, que é influenciada por diversos fatores dentre eles a idade do aterro, portanto, esses fatores também interferem na toxicidade. Ressalta-se, dessa forma, que para avaliar a toxicidade do lixiviado, é necessária uma investigação mais detalhada, que pode ser dada por meio da caracterização físico-química aliada aos ensaios ecotoxicológicos.

Uma outra característica apresentada na Tabela 1, são as sensibilidades dos organismos. O estudo de Restrepo *et al.* (2017) verificou que a espécie *D. Magna* ($CE_{50} < 1\%$) foi mais sensível ao lixiviado produzidos em reatores do que a espécie *A. fischeri* ($CE_{50} < 12\%$). A sensibilidade dos organismos está diretamente relacionada à composição dos contaminantes, os organismos aquáticos, por exemplo, apresentam maior sensibilidade a efluentes com elevadas concentrações de nitrogênio amoniacal (BERTOLETTI, 2009), enquanto que as plantas são mais sensíveis a efluentes com elevado teor de matéria orgânica (AYDIN *et al.*, 2015).

Para melhor avaliar a toxicidade do lixiviado, Luo *et al.* (2020) sugerem que sejam utilizadas espécies de diferentes níveis tróficos para melhor compreender seus efeitos em cada um dos níveis e assim traçar um perfil de toxicidade do contaminante. O estudo de Sackey *et al.* (2020) ao avaliar a toxicidade do lixiviado de três aterros sanitários em Gana também identificou sensibilidade diferentes entre o microcústáceo *Daphnia magna* e a lentilha d'água (*Lemna minor*). Portanto, a utilização de diferentes espécies na avaliação da toxicidade desse efluente deve ser um fator a considerar, em virtude, das variadas sensibilidades dos organismos.

Apesar de diversos estudos retratarem o uso de bioensaios na avaliação toxicológica do lixiviado, a sua maioria, tem como foco a investigação dos efeitos adversos do efluente no ecossistema aquático, mesmo quando utilizados espécies de plantas terrestres. Colombo *et al.* (2019), por exemplo, avaliaram a redução da toxicidade de lixiviado para futuro lançamento em corpo receptor por meio de teste de fitotoxicidade utilizando sementes de alface. Essa abordagem é mais comum devido ao potencial impacto do lixiviado na biota aquática. No entanto, os organismos do solo também estão sujeitos a contaminação de seu habitat em decorrência do lixiviado.

Atualmente, os organismos-teste que representam a contaminação de solo concentram-se na utilização da fitotoxicidade, assunto que será abordado na subsecção 3.4, apesar disso, o uso de outras espécies terrestres na avaliação de toxicidade de lixiviado no Brasil ainda é escassa. O estudo recente de Sales Junior *et al.* (2021) utilizou oligoquetas de espécie *Eisenia Andrei* para avaliar a toxicidade do lixiviado de aterro sanitário. Esse estudo, é um dos pioneiros na investigação dos efeitos adversos do lixiviado na fauna edáfica, no entanto, muito ainda se tem a investigar, pois como já mencionado o lixiviado é um efluente de composição complexa e variável.

3.3 Ensaios ecotoxicológico com minhocas

As minhocas são consideradas engenheiras do ecossistema devido atuarem na manutenção das propriedades físico-químicas do solo e no desenvolvimento da sua fertilidade (WANG *et al.*, 2021). O aumento da fertilidade do solo, de acordo com Singh, Singh e Vig (2016), está associado ao processo de mineralização que consiste na sua passagem através do intestino dos organismos, resultando na formação de húmus, um adubo de elevado poder nutricional. Além disso, os deslocamentos dos organismos formam galerias que aumentam a porosidade do solo, auxiliando na passagem de ar, nutrientes e água (SISINNO *et al.*, 2019a).

De acordo com Andréa (2010), as minhocas são excelentes bioindicadores de contaminação do solo, pois são sensíveis, fáceis de cultivar e manter e, ainda, podem ser utilizadas para a análise de diversos contaminantes.

Os neurorreceptores contido da superfície do corpo das minhocas permitem que esses organismos se comuniquem com o ambiente circundante (KLISZCZ e PULA, 2020), no entanto, o contato direto com solo contaminado com os metais, por exemplo, pode ocasionar a bioacumulação de substâncias nos organismos por meio da absorção via oral ou cutânea (HE *et al.*, 2018). Portanto, os resultados de testes ecotoxicológicos, utilizando esses organismos podem determinar os danos causados por poluentes e possíveis efeitos no ecossistema (PEREIRA *et al.*, 2020).

A avaliação de toxicidade utilizando minhocas baseiam-se em normativas padronizadas por organizações nacionais e internacionais como a Organização para a Cooperação e Desenvolvimento (OECD), a Organização Internacional de Normalização (ISO) e a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). Os testes padronizados têm como objetivo avaliar os efeitos de um substrato contaminado em organismos padrões, minhocas das espécies *Eisenia andrei* e *Eisenia fétida*, como representantes da biocenose do solo, cujos efeitos investigados serão determinados a partir o tempo de exposição do organismo ao contaminante.

Dentre os ensaios ecotoxicológicos com minhocas estão os testes de letalidade e o ensaio comportamental de fuga, por meio deles podem ser avaliados vários aspectos e efeitos causados aos organismos, como por exemplo as alterações comportamentais e morfológicas e a letalidade. O ensaio de letalidade, também chamado de ensaio de ecotoxicidade aguda, os organismos-teste são expostos a solos contendo contaminante e ao solo-controle (sem contaminação) e após 14 dias, quantifica-se o número de sobreviventes em cada situação de contaminação (ISO 11268-1, 2012a). O objetivo desse teste é detectar as concentrações que causam efeito letal aos organismos, ou seja as CL_x . Já o ensaio comportamental de fuga é um

método rápido de triagem que avalia a função do habitat dos solos e a influência de contaminantes e/ou produtos químicos no comportamento das minhocas (ISO 17512-1, 2011). Nesse ensaio subletal os organismos são expostos simultaneamente a um solo contaminado e a um solo-controle (sem contaminação), lado a lado, e após o período de exposição de 48 h realiza-se a contagem do número de indivíduos que estão em cada lado do solo.

Para Sisinni *et al.* (2019a) a mortalidade é um parâmetro fundamental na determinação da ecotoxicidade de uma substância química, mas algumas dessas substâncias não causam esse efeito a curto prazo, então, para os autores, também é importante utilizar ensaios que avaliem os efeitos subletais, como o ensaio comportamental de fuga.

A utilização de minhocas em ensaios ecotoxicológicos tem sido bastante aplicada para avaliação de áreas contaminadas ou para avaliação de efeitos que determinadas substâncias causam aos organismos. No Quadro 2 estão alguns estudos que avaliaram os efeitos de diferentes tipos de contaminantes em minhocas.

Quadro 2 - Estudos publicados que utilizam minhocas para avaliação de contaminantes

Contaminante	Parâmetros observados	Espécie	Referência
Metais pesados	Letalidade	<i>Eisenia andrei</i>	Hattab <i>et al.</i> (2020)
Pesticidas	Comportamento de fuga Letalidade	<i>Eisenia andrei</i>	Jordaan, Reinecke e Reinecke (2012)
Herbicidas	Comportamento de fuga Letalidade Biomarcadores enzimáticos	<i>Eisenia andrei</i>	Lackmann <i>et al.</i> (2018)
Arsênio	Comportamento de fuga Atividade de escavação de minhocas e Respiração	<i>Eisenia andrei</i>	Wang <i>et al.</i> (2021)
Águas residuárias tratadas	Biomarcadores enzimáticos	<i>Eisenia andrei</i>	Mkhinini <i>et al.</i> (2019)
Mercúrio	Bioacumulação	<i>Bimastus parvus</i>	He <i>et al.</i> (2018)
Lixiviado de aterro sanitário	Comportamento de fuga Letalidade Biomarcadores enzimáticos	<i>Eisenia Andrei</i>	Sales Junior <i>et al.</i> (2021)

Fonte: Autora (2021).

Cabe destacar que, as pesquisas que utilizam minhocas para avaliar a toxicidade de lixiviado de aterro sanitário são escassos. O estudo de He *et al.* (2018), por exemplo, avaliou a bioacumulação de mercúrio total (THg) em minhocas nativas de solos florestais contaminados com lixiviado de aterro sanitário. Os resultados desse estudo mostraram elevadas concentração de THg tanto nos organismos e como nos solos, chegando a ser 10 vezes maior que as

observadas nos locais de referência (sem contaminação). Já o estudo de Sales Junior *et al.* (2021) avaliaram a toxicidade do lixiviado por meio de testes de toxicidade aguda em solo natural e em contato com papel filtro; por ensaio comportamental de fuga e pela exposição crônica dos organismos durante 56 dias. Segundo os autores, o lixiviado de aterro sanitário resulta em altos riscos toxicológicos para os organismos terrestres.

3.4 Fitotoxicidade

A fitotoxicidade é um bioensaio que reflete a sensibilidade de determinada espécie de planta quando expostas a substâncias tóxicas. Devido ao solo estar sujeito a variados tipos de contaminação, seja ele por efluentes ou compostos químicos, então, conforme Pan e Chu (2016), as análises fitotoxicológicas são instrumentos capazes de mensurar os impactos ambientais terrestres, embora sejam complementares a outros ensaios.

Apesar dos testes de fitotoxicidade poderem envolver vários estágios de desenvolvimento da planta, geralmente são avaliados a germinação das sementes e o crescimento da raiz, como critérios investigativos da toxicidade. A norma OPPTS 850.4200 da US EPA (1996), que trata sobre os efeitos ecológicos na germinação das sementes e do alongamento da raiz, recomenda 10 espécies que podem ser utilizadas para a avaliação de toxicidade, dentre elas estão as espécies de tomate, alface e repolho. No geral, esse ensaio tem como objetivo determinar a CE_x , que se refere à Concentração Efetiva que causou $x\%$ da inibição do crescimento da raiz ou da germinação da semente.

Embora a germinação e o crescimento da raiz sejam parâmetros essenciais para avaliação fitotoxicológica, Bożym, Król e Mizerna (2020) considera que o crescimento da raiz melhor representa a toxicidade em decorrência do contato direto com o substrato e as substâncias tóxicas, sendo possível analisar os efeitos da estimulação de crescimento da planta. Corroborando com essa vertente Priac, Badot e Crini (2017) confirmam essa hipótese. Para esses autores o comprimento da raiz é um parâmetro sensível, apesar de ser mais difícil de medir do que a germinação absoluta.

A literatura apresenta diversos estudos que utilizaram a fitotoxicidade para avaliação de efluentes industriais, resíduos e solos contaminados (ADAMCOVÁ *et al.*, 2015; ENAIME *et al.*, 2020; BOŻYM, KRÓL e MIZERNA, 2021). Assim como essas aplicações, estudos recentes também abordam a utilização da avaliação fitotoxicológica de lixiviado de aterro sanitário. De acordo com Arunbabu, Indu e Ramasamy (2017) os vários poluentes contidos no lixiviado

exibem efeitos sinérgicos, antagônicos e aditivos nas plantas, portanto, a análise fitotóxica é essencial para determinar a toxicidade do lixiviado.

Analisar o potencial tóxico do lixiviado por meio da fitotoxicidade apresenta inúmeras vantagens em virtude de ser um teste biológico rápido, sensível e econômico, o que o torna mais útil e aplicável na avaliação de risco do efluente (GHOSH *et al.*, 2017). Luo *et al.* (2020) também sugerem a utilização desse teste em função da sua facilidade de realização quando comparados aos outros organismos-teste, porém, para os autores a utilização de mais de um organismo, principalmente, de diferentes níveis tróficos, ainda é a melhor abordagem para traçar o perfil toxicológico de lixiviado.

O Quadro 3 estão alguns estudos que avaliaram o efeito tóxico do lixiviado em diferentes espécies, como: alface, cebola, feijão, pepino, mostarda, tomate, repolho, rúcula e milho.

Quadro 3 - Espécies utilizadas para avaliação de toxicidade em lixiviado de aterro sanitário

Espécie		Referência
Nome científico	Nome popular	
<i>Sinapis alba L.</i>	Mostarda-branca	Vaverková (2019)
		Vaverková <i>et al.</i> (2020)
		Šourková <i>et al.</i> (2020)
<i>Lactuca sativa</i>	Alface	Colombo <i>et al.</i> (2019)
		Klauck, Rodrigues e Silva (2015)
		Franco <i>et al.</i> (2017)
<i>Vigna radiata</i>	Feijão	Zulkepli <i>et al.</i> (2020)
<i>Cucumis sativus L.</i>	Pepino	Franco <i>et al.</i> (2017)
<i>Vigna unguiculata (L.) Walp</i>	Feijão	Arunbabu, Indu e Ramasamy (2017)
<i>Allium cepa</i>	Cebola	Klauck, Rodrigues, Silva (2015)
		Klauck <i>et al.</i> (2017)
		Adeyemi-Ale, Anifowoshe e Abdulkareem (2018)
<i>Solanum lycopersicum</i>	Tomate	Gomes (2017)
		Budi <i>et al.</i> (2016)
<i>Zea mays L.</i>	Milho	Li <i>et al.</i> (2017)
<i>Brassica oleraceae</i>	Repolho	Gomes (2017)
<i>Eruca sativa Mill.</i>	Rúcula	Klauck, Rodrigues, Silva (2015)

Fonte: Autora (2021).

Vaverková (2019) avaliou a fitotoxicidade do lixiviado de um aterro localizado na República Checa durante 4 meses, cujos parâmetros analisados foram a germinação da semente e o crescimento da raiz. Segundo os autores, as sementes de mostarda *Sinapis alba L.* quando expostas ao lixiviado *in natura*, sem diluição, causou em média $97,35 \pm 2,28\%$ de inibição do crescimento das sementes, e a menor concentração investigada, que foi de 25%, causou inibição de $7,26 \pm 6,01$. Nessa pesquisa, notou-se que algumas amostras causaram maiores inibições que outras, possivelmente, influenciada pela composição do lixiviado.

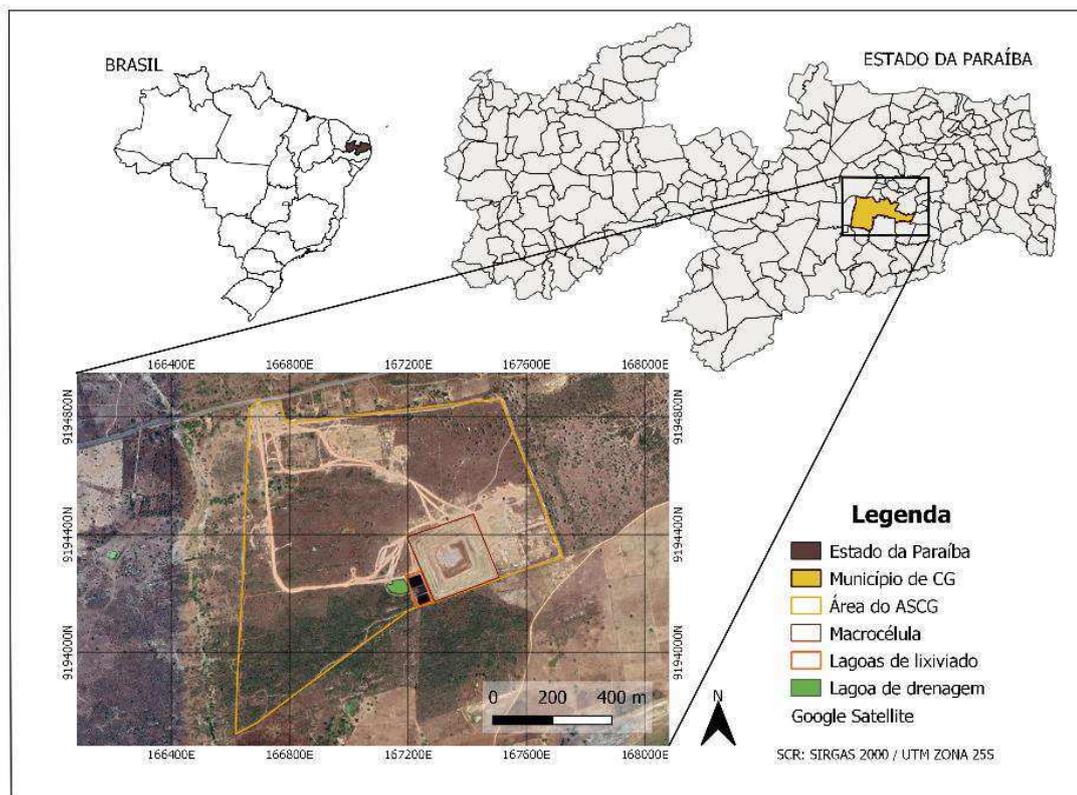
Diante disso, o monitoramento do lixiviado que utilizem testes ecotoxicológicos como complemento das análises físico-químicos, é importante para avaliar os riscos que o lixiviado pode causar ao longo da vida útil de um aterro sanitário, principalmente, devido sua composição variada. Deste modo, a utilização de bioensaios de fácil aplicação, como a fitotoxicidade, facilita a investigação toxicológica do efluente sendo possível torná-la uma análise de rotina.

4 METODOLOGIA

4.1 Área de estudo

O Aterro Sanitário em Campina Grande - Paraíba (ASCG) está localizado no Distrito de Catolé de Boa Vista, no km 10 da Rodovia PB 138, especificamente nas coordenadas UTM 829172 e 9194834 (Figura 1). O ASCG teve sua operação iniciada no mês de julho de 2015, e foi projetado para uma disposição diária de 350 toneladas, de Resíduos Sólidos Urbanos (RSU), com uma vida útil de 25 anos (ECOTERRA, 2010). Contudo, no período que correspondeu a coleta de dados desta pesquisa, outubro de 2020 a abril de 2021, no ASCG depositou uma média diária de 650 t RSU.dia⁻¹, provenientes de 46 municípios paraibanos e 2 pernambucanos, sendo a maior parcela dos resíduos depositados (79%) referente ao município de Campina Grande.

Figura 1 - Localização do ASCG



Fonte: Autora (2021).

O aterro conta com duas Macrocélulas de resíduos sólidos denominadas de Macrocélula 1, com dimensões 210 x 210 x 40 m (comprimento x largura x altura), cuja operação foi finalizada em fevereiro de 2020 e a Macrocélula 2, que atualmente recebe os resíduos sólidos urbanos, Figura 2. Todas as Macrocélulas possuem sistemas de impermeabilização de base e cobertura, que seguem as exigências da NBR 13.896 (ABNT, 1997), e sobre a camada de base

existe um sistema de drenagem de lixiviado, do tipo ‘espinha de peixe’, responsável conduzir o efluente gerado até a lagoa de acúmulo e evaporação de lixiviado (L1), (Figura 2). O ASCG ainda conta com mais três lagoas de acúmulo e evaporação (L2, L3 e L4) que são preenchidas com lixiviado, por meio de bombeamento, após a L1 atingir sua capacidade de armazenamento. Para evitar a contaminação dos recursos naturais, todas as lagoas são revestidas por uma Geomembrana de Polietileno de Alta Densidade (PEAD) com 3 mm de espessura.

Figura 2 - Células do ASCG e as lagoas de acúmulo e evaporação de lixiviado



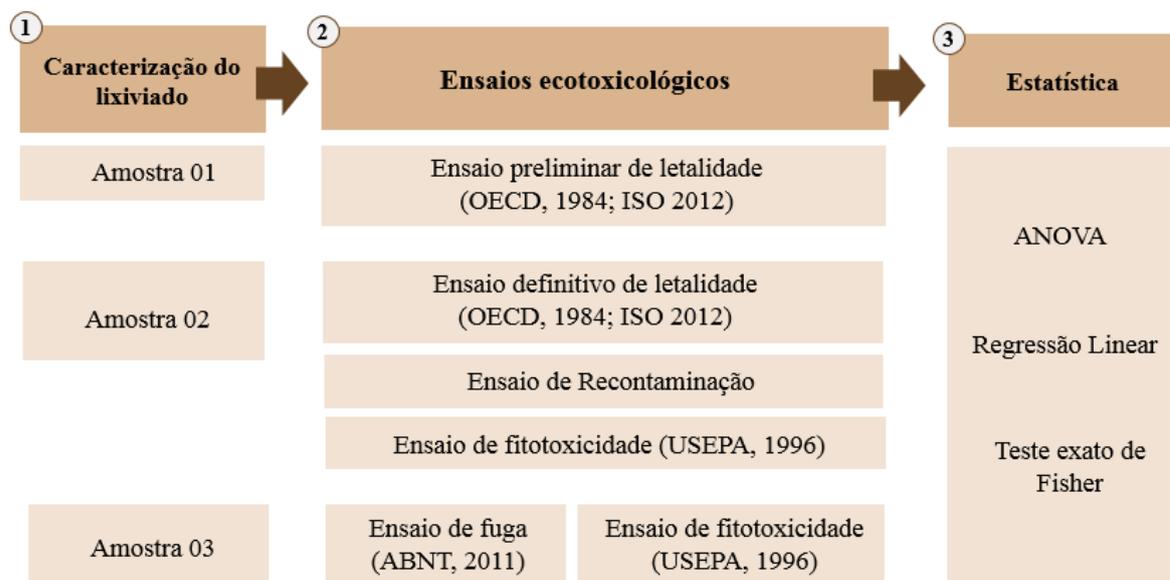
Fonte: Adaptado do acervo GGA (2020).

A geração de lixiviado no ASCG, desde o início de sua operação, apresenta médias mensais inferiores a $41 \text{ m}^3.\text{dia}^{-1}$, no entanto, no período que se referiu a esta pesquisa a vazão média de lixiviado foi de $19,31 \text{ m}^3.\text{dia}^{-1}$.

4.2 Etapas metodológicas

Para determinar a ecotoxicidade do lixiviado estudado foram realizadas três etapas que envolveram: (i) a caracterização do lixiviado por meio de indicadores físico-químicos; (ii) os ensaios ecotoxicológicos utilizando minhocas *Eisenia andrei* e sementes de tomate (*Solanum lycopersicum*), repolho (*Brassica oleraceae*) e alface (*Lactuca sativa*); e (iii) a interpretação e análise estatísticas dos resultados, as quais estão descritas na Figura 3. Cada umas das etapas serão abordadas nas seções seguintes.

Figura 3 - Etapas metodológicas da pesquisa



Fonte: Autora (2021).

4.3 Coleta e caracterização do lixiviado

O lixiviado utilizado nesse estudo, correspondeu ao efluente gerado nas Macrocélulas 1 e 2 de resíduos do ASCG. Esse efluente foi coletado na tubulação de descarga na lagoa de acúmulo e evaporação L1. No total, foram realizadas três amostragens de lixiviado *in natura* (A1, A2, A3). A coleta das amostras A1 e A2 aconteceram no período de seca da região, nas respectivas datas 18/11/2020 e em 20/01/2021 e a amostra A3 foi realizada em 07/04/2021, correspondendo ao período chuvoso.

A amostra A1 foi utilizada no ensaio preliminar de letalidade; a amostra A2 foi utilizada nos ensaios definitivo de letalidade, de recontaminação e no primeiro ensaio de fitotoxicidade; e a amostra A3 foi utilizada para o ensaio comportamental de fuga e no segundo ensaio de fitotoxicidade. As amostras utilizadas nos ensaios ecotoxicológicos foram coletadas e mantidas congeladas até seu uso, respeitando as recomendações da NBR 15469 (ABNT, 2015).

É importante frisar que a mesma amostra não foi utilizada em todos os ensaios em virtude das limitações existentes no laboratório e do número insuficiente dos organismos cultivados (minhocas). Devido a cultura das minhocas possuir apenas nove meses, então, foi necessário esperar o desenvolvimento dos organismos até que atingissem a idade e peso ideal para a realização dos testes. Cujas idade ideal dos organismos é de no mínimo 2 meses e o peso deve estar na faixa de 300 a 600 mg.

A caracterização físico-química das amostras de lixiviado *in natura* ocorreu mediante a determinação de indicadores físico-químicos apresentados no Quadro 4, seguindo as

metodologias recomendadas pelo *Standard Methods* (APHA, 2017). Os ensaios foram realizados nos Laboratório de Geotecnia Ambiental (LGA I) e no Laboratório de Geotecnia Ambiental e Biotecnologia (LGAB II) pertencentes a Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), campus sede.

Quadro 4 - Indicadores e métodos utilizados para a caracterização do lixiviado

Indicadores físico-químicos	Métodos (APHA, 2017)	
Potencial Hidrogeniônico (pH)	Eletrométrico	Método 4500 - H+ B
Alcalinidade Total (AT)	Titulação Potenciométrica	Método 2320 B
Nitrogênio Amoniacal Total (NAT)	Destilação e titulação	Método 4500 – NH3 C
Cloretos	Argentométrico (Método de <i>Morh</i>).	Método 4500 – Cl B
Demanda Química de Oxigênio (DQO)	Refluxação fechada	Método 5220 C
Sólidos Voláteis Totais (SVT)	Calcinação	Método 2540 E

Fonte: Autora (2021).

A determinação dos teores de metais presentes no lixiviado foram identificadas apenas nas amostras A2 e A3, cuja ausência dessa avaliação na amostra A1 justifica-se devido à problemas operacionais. As análises de metais foram realizadas no Laboratório de Química Analítica (LQA) do Instituto Tecnológico de Pernambuco – ITEP, sendo as amostras transportadas via terrestre e preservadas seguindo as recomendações do LQA. No total foram identificados os seguintes elementos: Alumínio (Al), Chumbo (Pb), Cromo (Cr), Ferro (Fe), Manganês (Mn) e Zinco (Zn), determinados por Espectrometria de Emissão de Plasma, Método 3120-B e 3030-K do SMWW, 23ª Ed., (APHA, 2017).

4.4 Ensaios ecotoxicológicos com minhocas

4.4.1 Organismos-teste

O organismo-teste utilizado nesta pesquisa foram minhocas da espécie *Eisenia andrei*, também conhecida como “vermelha da Califórnia”, Figura 4. As matrizes de minhocas foram adquiridas na empresa “Minhobox”, atuante no ramo de minhocultura desde 1993 e localizada no município de Juiz de Fora, estado de Minas Gerais, Brasil. A escolha desse organismo se deu em função da sua utilização em testes ecotoxicológicos que avaliam a qualidade do solo, os quais são normatizados e recomendados pelas normas NBR ISO 17512-1 (ABNT, 2011), ISO 11268-1 (ISO, 2012a) e NBR ISO 15537 (ABNT, 2014). Na realização dos ensaios

ecotoxicológicos foram utilizados apenas organismos adultos, com idade aproximada de 2 meses, apresentando clitelo aparente, e pesando de 300 a 600 mg.

Figura 4 - Minhoca da espécie *Eisenia andrei*



Fonte: Acervo de pesquisa (2021).

4.4.2 Criação e manutenção dos organismos

Esta pesquisa envolveu todas as etapas de implantação dos ensaios ecotoxicológicos com minhocas, uma vez que, esse tipo de organismo estava sendo testada pela primeira no Grupo de Pesquisa de Geotecnia Ambiental – GGA. Sendo assim, foi necessário adequar as condições existentes no laboratório para acondicionar os organismos, de modo que o ambiente favorecesse a criação e manutenção das minhocas. Essa etapa da pesquisa, realizou-se no Laboratório de Geotecnia Ambiental e Biotecnologia (LGAB II) da Universidade Federal de Campina Grande – UFCG.

Após a aquisição dos organismos, eles foram colocados em caixas de criação adequadas, a fim de estimular a reprodução e o desenvolvimento até que apresentassem as características ideais para a realização dos ensaios. As caixas de criação adotadas foram de material plástico transparente, com capacidade de 10 L (OECD, 2004), também chamada de caixa organizadora, com a finalidade de permitir o fotoperíodo de 12 h com a presença de luz e 12 h na ausência (Figura 5). Para haver a circulação de ar, as tampas foram perfuradas e colocadas pedados de Tecido Não Tramado – TNT.

Figura 5 - Caixa de criação das minhocas



Fonte: Acervo de pesquisa (2021).

Cada caixa de criação recebeu uma etiqueta de identificação que continham as seguintes informações: número da caixa de criação, data da incubação, idade aproximada dos organismos, data prevista para retirada, e um campo de observação para o controle da realimentação. Os indivíduos foram separados em quatro grupos de criação: filhotes e casulos, juvenil I, Juvenil II e adultos, de acordo com o tamanho. Nas caixas de criação foram inseridos alimento composto por esterco bovino, areia e fibra de coco, mistura que será abordada na próxima subseção.

Para manter a temperatura ideal de criação, os organismos foram mantidos em sala climatizada em temperatura de 24° C a 26° C, com objetivo de manter a temperatura interna das caixas de criação em 25° C, podendo ainda variar de 25° C a 28° C, como recomendado pela NBR ISO 15537 (ABNT, 2014). O monitoramento da temperatura das caixas de criação foi realizado diariamente, nos primeiros dois meses de adequação, em seguida, semanalmente, com o auxílio de um termômetro culinário inserido no interior da caixa (Figura 6).

Figura 6 - Monitoramento da temperatura das caixas de criação



Fonte: Acervo de pesquisa (2021).

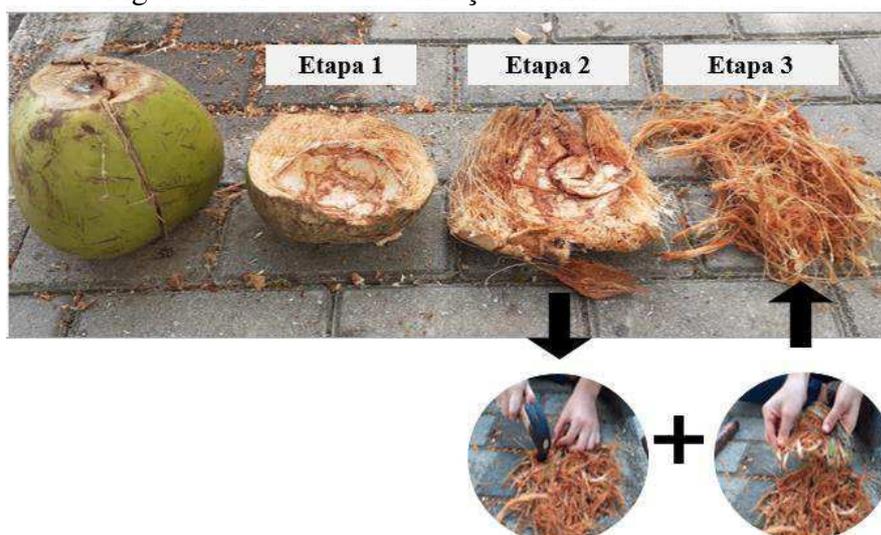
4.4.2.1 Alimento de criação

O alimento de criação das minhocas foi composto por esterco bovino, fibra da casca do coco e areia fina. Essa composição consistiu em uma adaptação da ISO 11268-2 (ISO, 2012b) e do estudo de Garcia (2004) enfatizando com isso, a disponibilidade dos materiais em escala local para a melhor viabilidade da pesquisa na região.

O esterco bovino foi adquirido em criadouro local, na cidade de Campina Grande- PB, sendo ele fragmentado manualmente e lavado por pelo menos três vezes em água corrente. Esse procedimento foi necessário para retirar parte da urina e outros materiais misturados ao esterco, como pedaços de madeira e folhagem. Em seguida, o material foi exposto ao sol por 48 h para secagem. A areia foi adquirida em loja de material de construção, em comércio local, lavada em água corrente para retirar as possíveis impurezas e submetida à secagem natural ao sol.

O terceiro componente do alimento, a fibra da casca do coco (Fibra CC), foi extraída manualmente. Inicialmente foi realizada a coleta de cocos verdes em quiosques nas proximidades da Universidade e em seguida, os cocos foram repartidos ao meio e retirada a poupa (Figura 7 - Etapa 1). Para facilitar a extração da fibra, foi utilizado uma marreta para amolecer a casca (Figura 7 - Etapa 2) e posteriormente, com o auxílio de um martelo foi obtida a fibra de coco por meio de desfiamento manual. A Figura 7 mostra o procedimento de extração. Após essa etapa, a fibra foi exposta ao sol, para secagem natural, por 5 dias.

Figura 7 - Processo de extração da fibra de coco



Fonte: Acervo de pesquisa (2021).

O preparo do alimento deu-se pela mistura desses três componentes após total secagem. O esterco e a areia ainda foram peneirados em malhas de 4,70 mm e 1,2 mm, respectivamente,

e a fibra de coco foi desfiada em um triturador de resíduos orgânicos e a posteriori, picotada com tesoura até atingir tamanhos médios de 2 cm. O alimento teve a seguinte proporção em volume: 2: 1 e 0,10 (esterco, fibra de coco e areia), considerando a quantidade de areia, o valor de 10% do somatório do peso do esterco mais a fibra (SCHIEDECK *et al.*, 2019), Figura 8.

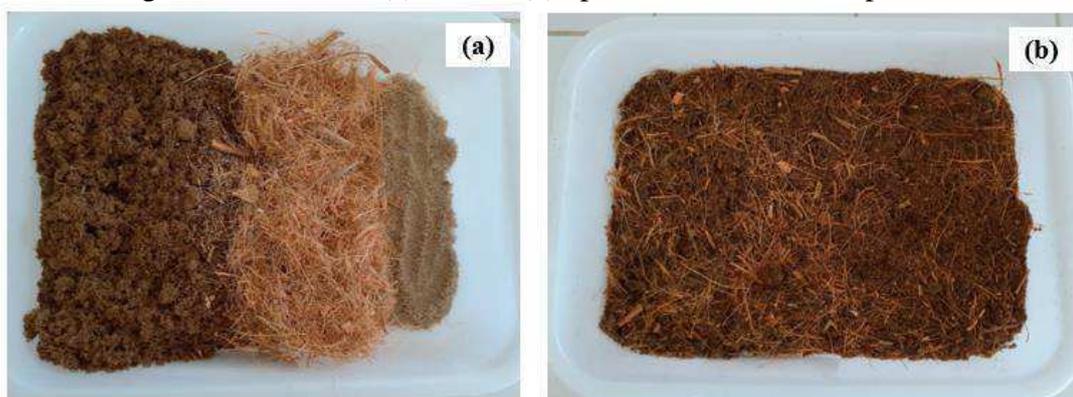
Figura 8 - Composição do alimento em volume



Fonte: Acervo de pesquisa (2021).

Transformando as proporções de volume em peso, obteve-se que para cada 160 g de esterco, foi utilizado 40 g de fibra da casca de coco e 20 g de areia fina. A Figura 9 (a, b) mostra o alimento antes e após a mistura dos três componentes.

Figura 9 - Alimento (a) antes e (b) após a mistura das componentes



Fonte: Acervo de pesquisa (2021).

4.4.2.2 Correção do pH

Antes de disponibilizar o alimento aos organismos foi necessário corrigir o pH, uma vez que, a fibra da casca de coco possui valor de pH inferior a 5, podendo causar acidez ao meio. Para que o alimento esteja em condições favoráveis, para o desenvolvimento das minhocas, o

pH deve estar na faixa de 6 a 7 (ISO, 2012b; OECD, 2004). Então, para a correção do pH foi adicionado em béqueres, com capacidade de 1 L, 25 g de alimento, 100 mL de água destilada e quantidade crescentes de Carbonado de Cálcio (CaCO_3), a fim de determinar o quantitativo de CaCO_3 a ser adicionada em cada quilograma de alimento (SCHIEDECK *et al.*, 2019). Em seguida, essa mistura foi agitada por 5 min e submetidas ao repouso por 24 h (Figura 10), e posteriormente, foi feita a aferição do pH.

Figura 10 - Teste de correção de pH do alimento



Fonte: Acervo de pesquisa (2021).

Após testar variadas concentrações de CaCO_3 , a quantidade avaliada que melhor representou o estudo foi de 2,5 g de CaCO_3 para cada 25 g de alimento, obtendo assim, um pH de 6,35. Logo, para cada 1000 g de alimento foi utilizado 100 g de CaCO_3 , a Tabela 2 contém as proporções dos insumos para cada 1000 g esterco.

Tabela 2 - Proporções ideais dos insumos que compõe o alimento de criação

Insumos	Peso (g)
Esterco seco	1000
Fibra da casca de coco seca	150
Areia	115
CaCO_3	126

Fonte: Autora (2021).

4.4.2.3 Umidade do alimento

A umidade do substrato de criação deve estar na faixa de 70 a 90%, sendo os valores ideais entre 80 e 85% (SCHIEDECK *et al.*, 2019). Nesta pesquisa, o umedecimento do alimento de criação foi feito com água desclorada por 48 h. Em relação à quantidade de água adicionada à composição, a verificação foi realizada de forma manual à medida em que se adicionava água à mistura (Figura 11). Ao pressionar o alimento com a mão observou-se as seguintes condições: se não escorresse água, o alimento estava seco e necessitava adicionar mais água; se surgissem algumas gotas entre os dedos, a umidade estava adequada; no entanto, se escoasse grande

quantidade de água pela mão, deveria então, suspender o umedecimento e adicionar um pouco mais de alimento seco até alcançar a umidade ideal (SCHIEDECK *et al.*, 2006).

Figura 11- Teste da umidade do alimento



Fonte: Acervo de pesquisa (2021).

Além da verificação manual, a umidade do alimento foi determinada por meio do Método gravimétrico padrão da estufa de acordo com a NBR 6457 (ABNT, 1986). Para isso, foram pesadas em balança analítica e identificadas três cápsulas de alumínio e posteriormente adicionou-se, em cada uma delas, cerca de 29 g de alimento umedecido, os quais corresponderam ao Peso Úmido da amostra (PU). Em seguida, as amostras de alimento foram levadas para estufa de secagem e deixadas por 48 h em temperatura de 60° C. Passado o período, as amostras de alimento foram novamente pesadas e descontadas o peso de cada uma das cápsulas, determinando assim o Peso Seco da amostra (PS). Após calcular a média do PU e PS referente às 3 replicatas, a umidade foi calculada mediante à Equação 1.

$$U (\%) = \frac{(PU-PS)}{PS} \times 100 \quad \text{Equação (1)}$$

Em que:

U (%): Umidade expressa em porcentagem

PU: Peso da amostra úmida, em gramas

PS: Peso da amostra seca, em gramas

4.4.2.4 Teste de aceitação do alimento

Após a correção do pH e verificação da umidade do alimento, foi realizado o teste de aceitação com as minhocas *Eisenia andrei*, o qual consistiu na preparação de 120 g de alimento seco que, depois de umedecido, foi disposto em um béquer com capacidade de 1 L. Em seguida, foram colocados sobre a superfície do alimento 10 organismos adultos com clitelo aparente e peso variando de 350 a 600 g e deixados por 24 h. Após isso, o recipiente foi fechado com Tecido Não Tramado (TNT) para permitir a troca de ar com o meio externo (Figura 12). Nesse teste, foram observados o tempo em que os organismos demoraram a entrar no alimento, a rejeição, observando a existência de fuga do alimento, e após as 24 h foi observado a sobrevivência e aspectos comportamentais como lentidão, manchas no corpo e deformações.

Figura 12 - Teste de aceitação do alimento



Fonte: Acervo de pesquisa (2021).

4.4.2.5 Realimentação

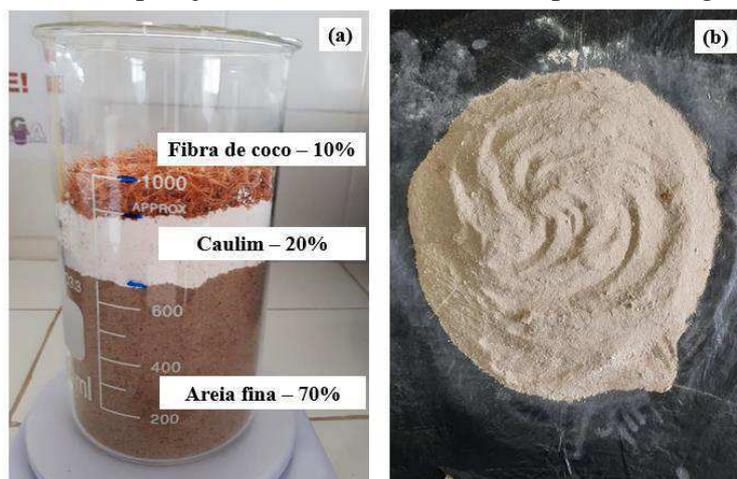
A realimentação dos organismos foi feita mensalmente, de modo que 50% do substrato contido na caixa de criação (húmus + alimento) foi retirado e um novo alimento adicionado. Esse novo alimento, cujas proporções dos insumos foram definidas nas subseções 4.4.2.1 e 4.4.2.2, não teve adição de carbonato de cálcio para a correção do pH. Tal medida foi adotada, uma vez que, em 1 mês após a primeira alimentação, verificou-se que o pH do substrato teve um aumento considerável, apresentando $\text{pH} > 7,5$. No entanto, quando o substrato de criação teve sua troca em 100% as proporções do alimento adicionado seguiram as definidas nas subseções 4.4.2.1 e 4.4.2.2.

Em algumas caixas de criação o consumo de alimento dava-se mais rapidamente, então, além da realimentação mensal, foi realizada uma nova adição de alimento quinzenalmente, cerca de 20% do volume contido nas caixas de criação. Para potencializar o processo de ganho de biomassa nos meses antecedentes aos ensaios (março e abril de 2020) foram adicionados nas caixas de criação, que continham apenas organismos adultos, a quantidade de 10 g pó de café para cada quilo de alimento umedecido (ZIBETTI *et al.*, 2015).

4.4.3 Substrato-teste

O substrato-teste utilizado nos ensaios ecotoxicológicos, o qual foi contaminado com lixiviado do ASCG, consistiu em um Solo Artificial Tropical (SAT), composto por 70% de areia fina, 20% de caulim e 10% da fibra da casca de coco, em volume, como mostra a Figura 13a. Essa composição foi uma adaptação da recomendada pela OECD 207 (OECD, 1984) e por Garcia (2004), em decorrência da disponibilidade dos materiais no local em que se desenvolveu a pesquisa. Transformando as proporções de volume em gramas, para um volume de 1 L, foram utilizadas 865 g de areia fina, 123 g de caulim e 12 g de fibra da casca de coco, totalizando 1000 g de SAT, Figura 13b.

Figura 13 - Composição do SAT (a) antes e (b) após a homogeneização



Fonte: Acervo de pesquisa (2021).

Quanto a origem dos materiais, a areia fina e a fibra da casca de coco tiveram a mesma aquisição e preparação abordada na subseção 4.4.2.1, já o terceiro componente, o caulim, foi adquirido na empresa VN Química, localizada na cidade de Campina Grande - PB, da marca DBM Minerais Soledade LTDA. Para que não houvesse contaminação do SAT por microrganismos, o caulim passou por processo de esterilização na autoclave por 20 min. Nesse

processo, o caulim foi colocado em erlenmeyer de 500 mL, fechado com algodão e vedado com plástico filme, em seguida foi submetido a esterilização.

Na preparação do SAT ainda foi necessário realizar mais três etapas: a primeira, a correção do pH; a segunda, o ajuste da umidade; e a terceira, o teste de aceitação dos organismos. A correção do pH foi feita por meio da adição de CaCO_3 , sendo o pH ideal na faixa de $6 \pm 0,5$ (OECD, 1984). Para isso, foi preparado 500 g de SAT (432,5 g de areia, 61,5 g de areia fina e 6 g de fibra da casca de coco) e em seguida foi retirado alíquotas de 10 g e colocados em béquer de 100 mL.

Em cada béquer foi adicionado quantidades crescentes de CaCO_3 e posteriormente, adicionado 50 mL da solução de Cloreto de Cálcio (CaCl_2) 0,01 M em cada amostra, sendo necessário agitar cada recipiente por 5 min (ABNT, 2012; NIEMEYER *et al.*, 2019). Em seguida, os recipientes ficaram em repouso por um período de 2 horas para que fosse realizada a medição do pH, não necessitando agitar a amostra. A Tabela 3 mostra as quantidades em gramas de CaCO_3 adicionado em cada amostra e o pH resultante após a medição. Devido à faixa de 0,01 e 0,02, ser a ideal, então para este estudo foi utilizado 0,015 g para cada 10 g de SAT, o que consistiu em 1,5 g de CaCO_3 para cada 1000 g de SAT, resultando em pH igual a 6,35.

Tabela 3 - Ajuste do pH do SAT

CaCO_3 (g)	pH
0.00	4.25
0.01	5.92
0.02	6.47
0.03	6.95
0.04	6.92
0.06	7.02
0.08	7.07
0.10	7.23

Fonte: Autora (2021).

A segunda etapa consistiu no ajuste de umidade do SAT, ou seja, a quantidade de água destilada ou de contaminante em estado líquido, que foi adicionado ao SAT para a realização dos ensaios ecotoxicológicos. Segundo a ISO 11268-2 (ISO, 2012b), a umidade ajustada deve estar na faixa de 40 a 60% da Capacidade de Retenção de Água (CRA) do solo. A determinação da CRA do SAT foi calculada mediante o método descrito na norma ISO 11268-2 (ISO, 2012b). Após realizar todo o procedimento obteve-se uma CRA de 18,7%, o que correspondeu a aproximadamente 4,69 g de água para os 25 g de SAT testado. Neste estudo, optou-se por utilizar 55% da CRA, logo, para cada 25 g de SAT utilizou-se 2,58 g de água, o que resultou

na adição de 103,2 g de água destilada ou contaminante líquido diluído, ou seja, 103,2 mL, para cada 1000 g de SAT utilizado.

A terceira etapa foi referente ao teste de aceitação dos organismos, em que, em um béquer com capacidade de 1 L colocou-se 500 g de SAT, com pH corrigido e a umidade ajustada. Em seguida, sobre sua superfície do SAT foi colocado 10 organismos adultos com clitelo aparente, pesando entre 300 e 600 mg. Os organismos foram deixados no SAT por 24 h e passado o período, foi verificado se houve letalidade e alterações no comportamento dos organismos.

4.4.4 Ensaio de letalidade

Os efeitos adversos causados aos organismos e as concentrações letais foram avaliados pelo ensaio de toxicidade aguda em SAT contaminado com lixiviado. O ensaio de letalidade envolveu três etapas: a primeira, o ensaio preliminar; a segunda, o ensaio definitivo; e a terceira, o ensaio de recontaminação. As concentrações testadas em cada uma das etapas serão abordadas nas subseções seguintes. É importante frisar que os ensaios preliminar e definitivo foram baseados na norma da OECD 207 (OECD, 1984) e ISO 11268-1 (2012a), já o ensaio de recontaminação não se baseou em normas específicas, visto que, na literatura técnica ainda não há estudos que apresentem esse ensaio. No entanto, esse último, seguiu os mesmos procedimentos e as mesmas condições que foram consideradas nos ensaios preliminar e de letalidade.

Antes da realização dos ensaios de letalidade (preliminar e definitivo) foi necessário retirar os organismos do ambiente de criação por pelo menos 24 h e colocá-los em solo-controle (ISO, 2012a). Desta forma, os organismos que apresentavam as características ideais de peso entre 300 e 600 mg e com pelo menos 2 meses de idade, apresentando clitelo aparente, foram retirados do alimento de criação, lavados com água destilada, colocados em papel toalha para a secagem e pesados individualmente, para em seguida serem aclimatados em SAT (Figura 14). Essa fase, chamada de aclimação tem por finalidade purgar/esvaziar o conteúdo intestinal dos organismos.

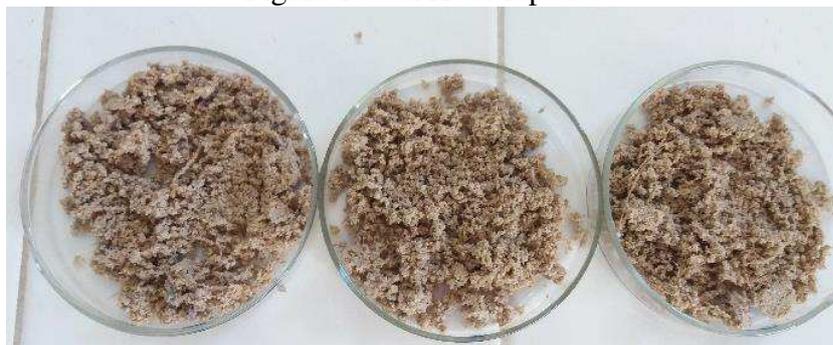
Figura 14 - Organismos em solo-controle para aclimação



Fonte: Acervo de pesquisa (2021).

O solo-controle utilizado na aclimação, um total de 3 kg, foi o SAT (subseção 4.4.3), que foi umedecido com água destilada na quantidade correspondente a 55% da CRA. Após as 24 h, os organismos foram novamente lavados com água destilada, colocados em papel filtro para secagem e separados em grupos de 10 indivíduos, para assim determinar o peso total do grupo. Posteriormente, cada grupo foi deixado em uma pequena porção de SAT em repouso (Figura 15) até serem inseridos no recipientes-teste.

Figura 15 - SAT de repouso



Fonte: Acervo de pesquisa (2021).

Os recipientes-teste utilizados nesses ensaios tinham capacidade de 1 L, sendo eles de material transparente, que permitiu o foto-período de 12 h com luz e 12 h na ausência de luz, e com tampa perfurada, a fim de permitir à troca gasosa (Figura 16). Para impedir a fuga dos organismos pelos orifícios das tampas, optou-se por colocar TNT antes de tampá-las. Em cada um dos recipientes-teste foram colocados 500 g de SAT seco que em seguida foi umedecido com 55% da CRA. Para o recipiente controle, cuja concentração do contaminante foi de 0%, o umedecimento foi feito com água destilada e para os demais tratamentos o umedecimento foi

realizado com lixiviado *in natura* do ASCG, diluído nas concentrações estabelecidas em cada ensaio.

Figura 16 - Recipientes- teste do ensaio de letalidade



Fonte: Acervo de pesquisa (2021).

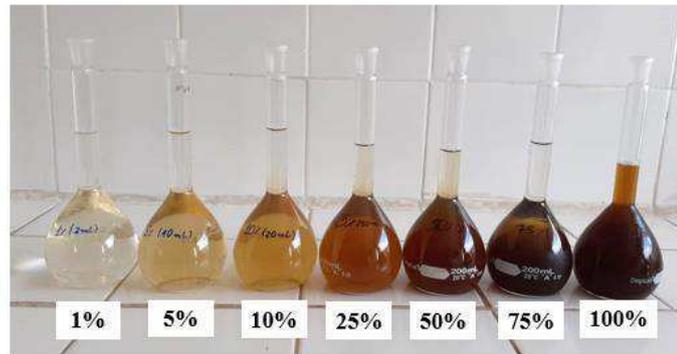
Durante o período de realização dos ensaios foi executado o monitoramento diário da umidade, por meio da pesagem dos recipientes-teste, e quando necessário realizou-se o ajuste. A temperatura do ambiente foi mantida na faixa $24 \pm 2^\circ \text{C}$ e, para ambos, nos ensaios não houve alimentação dos organismo.

4.4.4.1 Ensaio preliminar de letalidade

O ensaio preliminar de letalidade teve como objetivo determinar a faixa de concentração do lixiviado utilizada no ensaio definitivo de letalidade. Para isso, determinou-se a Concentração de Efeito não Observado (CENO), correspondendo a maior concentração de lixiviado que não causou efeito de letalidade e a Concentração de Efeito Observado (CEO), correspondendo a menor concentração que causou letalidade significativa em relação a amostra controle ou também denominada de amostra em branco.

Após a aclimação dos organismos, foram preparadas as diluições de lixiviado que foram testadas e adicionada no SAT. Nesse ensaio foram definidos oito tratamentos, o que corresponderam as concentrações de lixiviado: 0; 1; 5; 10; 25; 50; 75 e 100% (v/v), o equivalente a 0,0; 1,0; 5,2; 10,4; 26,0; 52,0; 78,0 e 104,0 mL.kg⁻¹ (v/p) (mililitro por quilograma de massa seca), Figura 17.

Figura 17 - Concentrações dos tratamentos utilizados no ensaio preliminar de letalidade



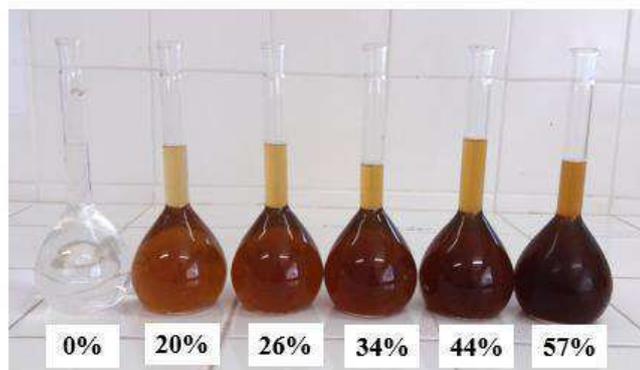
Fonte: Acervo de pesquisa (2021).

O ensaio teve duração de 7 dias e foi realizado em duplicata, cada uma contendo 10 indivíduos, o que totalizou na utilização de 160 organismos. Ao final do ensaio foram observados: a letalidade dos organismos; a perda de biomassa; alterações corporais como deformações e mudança na coloração da pele; alteração comportamental e foi estimada a CL_{50} de 7 dias, correspondendo à concentração que causou 50% da morte dos indivíduos.

4.4.4.2 Ensaio definitivo de letalidade

Após determinar as concentrações CENO e CEO, no ensaio preliminar de letalidade, que corresponderam a 10% ($10,4 \text{ mL.kg}^{-1}$) e 75% (78 mL.kg^{-1}) de lixiviado, respectivamente, foram estabelecidas as concentrações a serem testadas no ensaio definitivo de letalidade, considerando o fator de diluição de 1,3. Deste modo, foram analisados seis tratamentos correspondendo as seguintes concentrações de lixiviado: 0, 20, 26, 34, 44, 57% (v/v) o equivalente a 0,0; 20,8; 27,0; 35,2; 45,8; 59,4 mL.kg^{-1} (v/p), Figura 18. Para cada concentração foram feitas três réplicas, cada uma contendo 10 indivíduos, totalizando a utilização de 180 organismos.

Figura 18- Tratamentos utilizados no ensaio definitivo de letalidade



Fonte: Acervo de pesquisa (2021).

O ensaio teve duração de 14 dias e durante esse período foi feita a aferição do pH no dia do ensaio (dia zero), aos 7 e 14 dias pós-ensaio. O monitoramento da letalidade ocorreu diariamente, observando a existência de organismos mortos na superfície e na parede do recipiente-teste. Quando detectado a morte, os organismos foram retirados para não influenciar na letalidade dos demais. Ao 7º e 14º dia após o ensaio, os recipientes-teste foram verificados quanto as seguintes características: perda da biomassa; alterações corporais como deformações e mudança na coloração da pele; alteração comportamental; e número de organismos mortos. Sendo ainda estimada a CL_{50} de 72 h, 7 e 14 dias.

4.4.4.3 Ensaio de recontaminação

O ensaio de recontaminação consistiu em uma segunda exposição aos organismos que resistiram ao ensaio definitivo de letalidade, ou seja, aqueles que se mantiveram vivos, foram submetidos a uma nova contaminação. Cabe salientar que as normas OECD 207 (1984) e ISO 11268-1 (2012a) não discutem sobre esse tipo de ensaio, mas, nesta pesquisa achou-se necessário observar o comportamento dos organismos quando expostos novamente em solo contaminado com lixiviado, pois em casos de desastres ambientais pode haver mais de uma contaminação, como por exemplo, um vazamento contínuo de efluente, o que torna interessante observar este efeito.

Sendo assim, após o ensaio de letalidade os organismos foram submetidos a um novo alimento e deixados por 6 dias, nessa etapa foram observados o ganho de massa corporal e o efeito na aparência dos organismos. Após esse período, os organismos passaram pela aclimatação, com duração de 24 h, e em seguida, foram colocados novamente em solo artificial tropical contaminado com lixiviado, obedecendo as mesmas condições e concentrações da primeira exposição (ensaio definitivo de letalidade).

Para cada concentração de lixiviado testada no ensaio definitivo de letalidade foram selecionadas duas réplicas, de modo que foram escolhidas as que apresentavam o maior número de indivíduos vivos. Apenas a concentração de 57% (v/v) ($59,4 \text{ mL.kg}^{-1}$) não foi exposta a essa etapa devido ao número de organismos sobreviventes serem inferiores a 8 indivíduos por replicata. Assim, no total foram utilizados 93 organismos. A quantidade de organismos por réplica está na Tabela 4.

Tabela 4 - Quantidade de organismos utilizados no ensaio de recontaminação

Trat.	Conc. (%)	Conc. (mL.kg ⁻¹)	Réplicas	Quant. de organismos	Total de organismos
T0	0	0	R1	8	18
			R3	10	
T1	20	20,8	R1	10	20
			R3	10	
T2	26	27,0	R1	9	19
			R3	10	
T3	34	35,2	R1	8	18
			R2	10	
T4	44	45,8	R1	9	18
			R3	9	

Legenda: Conc. (%): concentração de lixiviado em porcentagem; Conc. (mL.kg⁻¹): concentração de lixiviado em mililitros por quilograma de massa seca de SAT.

Fonte: Autora (2021).

O ensaio seguiu os mesmos procedimentos que o ensaio definitivo de letalidade, possuindo duração de 14 dias e observando as mesmas características discutidas na subseção 4.4.4.2. No entanto, ao 7º dia pós-ensaio, além da medição do pH, foi feito a pesagem grupo dos organismos e, posteriormente, os organismos foram colocados novamente nos recipientes-teste até a finalização total do ensaio.

4.4.5 Ensaio comportamental de fuga

O efeito comportamental de fuga dos organismos foi avaliado mediante o teste de fuga descrito pela Norma NBR ISO 17512-1 (ABNT, 2011). O ensaio possuiu duração de 48 h, não havendo alimentação durante esse período. Para esse ensaio, também se realizou a aclimação por 24 h em SAT umedecido com água destilada.

Para avaliar o efeito comportamental de fuga, os organismos foram expostos em SAT contaminado em seis tratamentos considerando um fator de diluição de 1,4. As concentrações de lixiviado foram de 10,0; 14,0; 19,6; 27,4; 38,4 e 53,8% (v/v), equivalentes a 10,38; 14,53; 20,34; 28,47; 39,86 e 55,80 mL.kg⁻¹ de SAT seco. A definição dessas concentrações foi embasada nos resultados do ensaio preliminar de letalidade, pois a morte de mais de 10% dos organismos por replicada inviabiliza o teste, sendo esse o critério de aceitabilidade. Para este teste foi feito quatro réplicas por tratamento, totalizando a utilização de 240 organismos.

Os recipientes-teste (Figura 19a) utilizados nesse ensaio, tinham formato retangular, capacidade de 1 L, de material transparente, permitindo o foto-período de 12 h na ausência e 12 h na presença de luz, e com tampa perfurada para permitir a troca gasosa. Em cada recipiente foi adicionado 800 g de SAT seco, sendo ele dividido em duas seções. Uma das seções foi

preenchido com 400g de solo-controle (sem contaminação) e umedecido com água destilada e a outra seção foi preenchida com 400 g de substrato-teste, umedecido com os diferentes tratamentos. Em seguida, a divisória foi removida e entre as duas seções, foram adicionadas 10 minhocas (Figura 19b). Após os organismos entrarem no solo, o recipiente-teste foi tampado.

Figura 19 - Recipiente-teste do ensaio de fuga (a) e Colocação dos organismos no recipiente-teste (b)



Fonte: Acervo de pesquisa (2021).

Após as 48 h, a divisória foi adicionada novamente em cada uma das replicadas e foi contabilizado o número de organismos que se encontravam no solo-controle e no substrato-teste. Em caso de algum organismo ser repartido ao meio, contou-se 0,5 de indivíduos para cada lado. Em seguida, foi calculado fuga dos organismos mediante a equação abaixo.

$$F = \left(\frac{n_c - n_t}{N} \right) \times 100 \quad \text{Equação (2)}$$

Em que:

F: fuga expressa em porcentagem.

n_c : número de minhocas no solo-controle.

n_t : número de minhocas no solo-teste.

N: número total de minhocas.

Após o cálculo valores da fuga (F), seus efeitos observados seguiram a seguinte classificação: $F < 20\%$ não houve fuga observada (NF); $20 \leq F < 80\%$ houve efeito de fuga observado (FO); e $F \geq 80\%$ o substrato-teste causou a perda de habitat (PDH).

4.5 Teste de fitotoxicidade

Para avaliar o efeito tóxico do lixiviado, por meio da fitotoxicidade, foi utilizado sementes de tomate (*Solanum lycopersicum*), repolho (*Brassica oleraceae*) e alface (*Lactuca sativa*), espécies recomendadas pela US Environmental Protection Agency (US EPA, 1996). Esses ensaios foram realizados com as amostras A2 e A3 de lixiviado, com objetivo verificar variações na toxicidade entre as amostras e avaliar a sensibilidade das espécies expostas ao contaminante.

Como análise complementar, realizou-se a verificação da existência ou não de alteração na toxicidade entre o lixiviado fresco e o lixiviado preservado (mantido congelado). Sendo assim, após a coleta das amostras A2 e A3 de lixiviado, uma parte do efluente foi preservado e a outra parcela foi feito o teste de fitotoxicidade no mesmo dia de realização da coleta (dia zero). Para o ensaio utilizando o lixiviado fresco, foram testadas apenas as sementes de tomate e repolho, em virtude das limitações físicas do laboratório.

Nos testes de fitotoxicidade, o estudo analisou sete tratamentos, T1, T2, T3, T4, T5, T6 e T7, os quais corresponderam as concentrações de lixiviado *in natura* de 1,00; 1,50; 2,25; 3,38; 5,06, 7,60 e 11,39% (v/v) diluído em água destilada. Tais concentrações foram definidas em ensaios preliminares.

Sendo assim, o ensaio se procedeu da seguinte forma: com auxílio de uma pinça, foram distribuídas vinte sementes de cada espécie sobre duas camadas de papel filtro qualitativo (porosidade 110 mm) e inseridas em placas de Petri (Ø10 cm). Em seguida, em cada placa de Petri, foi adicionado 9 mL dos tratamentos. O ensaio foi realizado em triplicata, de modo que, para cada tipo de semente foram feitas três réplicas por tratamento. A amostra em branco, definida como o controle, seguiu as mesmas condições, porém foi utilizada água destilada em seu umedecimento.

Posteriormente, as placas foram incubadas em estufa do tipo BOD (marca Lab1000, modelo LM-700.275.2) e mantidas a 20 ± 2 ° C, em ausência de luz, por 120 h (5 dias). Esse procedimento foi realizado de forma estática. Após o período de incubação foi realizada a leitura do ensaio, que consistiu na medição do comprimento das raízes por meio de uma régua graduada. Foram medidos apenas as sementes que apresentaram crescimento igual ou superior a 0,5 cm, sendo essas sementes contabilizadas como sementes germinadas.

A avaliação da fitotoxicidade foi feita mediante a determinação dos parâmetros: crescimento da raiz; Crescimento Relativo da Raiz (CRR); Germinação Relativa das Sementes (GRS); Índice de Germinação (IG) e a Concentração efetiva que causou inibição no crescimento

de 50% das sementes (CE_{50}). No entanto, na comparação da fitotoxicidade entre a amostra fresca e a preservada, avaliou-se apenas o crescimento da raiz e a CE_{50} .

Para a determinação do CRR, foram medidos para cada um dos tratamentos o Comprimento da Raiz da Amostra (CRAm) e o Comprimento da Raiz do Controle (CRC), os quais corresponderam aos valores médios de crescimento obtidos nas replicatas. Após essa etapa, o CRR foi calculado pela Equação 3 (PINHO *et al.*, 2017).

$$CRR (\%) = \frac{CRAm}{CRC} \times 100 \quad \text{Equação (3)}$$

A GRS foi calculada por meio da contagem do número de Sementes Germinada nas Amostras (SGA) e do número de Sementes Germinadas no Controle (SGC) de cada um dos tratamentos, e assim determinado o GRS, Equação 4 (PINHO *et al.*, 2017).

$$GRS (\%) = \frac{SGA}{SGC} \times 100 \quad \text{Equação (4)}$$

Por fim, foi calculado o IG, o qual correspondeu ao grau de fitotoxicidade do efluente testado, Equação 5 (PINHO *et al.*, 2017). O grau de toxicidade do efluente foi classificado segundo Trautmann e Krasny (1997), Quadro 5.

$$IG (\%) = \frac{GRR \times CRR}{100} \quad \text{Equação (5)}$$

Quadro 5 - Classificação do grau de fitotoxicidade

Faixa	Classificação	Classificação do estudo
IG > 80%	Sem inibição	Não fitotóxico
60% < IG < 80%	Inibição leve	Pouco fitotóxico
40% < IG < 60%	Inibição forte	Fitotóxico
IG < 40%	Inibição grave	Muito fitotóxico

Legenda: IG: Índice de Germinação.

Fonte: Adaptado de Trautmann e Krasny (1997).

4.6 Análise estatística

No ensaio de toxicidade aguda com as minhocas, que envolveu os três ensaios de letalidade, foram utilizadas as análises estatísticas Regressão Linear simples para a estimativa da CL_{50} e para avaliar as mudanças de biomassa e de alterações no pH utilizou-se a Análise de

variância (ANOVA) de fator único, considerando um nível de significância de 5%. Enquanto que, no ensaio de fuga utilizou-se teste Exato de *Fisher*, o qual avalia a existência de fuga significativa.

Os dados resultantes do ensaio de fitotoxicidade foram analisados por meio da ANOVA, a fim de verificar a diferença estatística entre: (1) as amostras A2 e A3 de lixiviado; (2) os tratamentos; e (3) as espécies utilizadas. Em seguida utilizou-se a Regressão linear simples para a estimativa CE_{50} , a qual correspondeu a concentração que causou 50% da inibição do crescimento da raiz em relação a amostra em branco.

Todos os testes estatísticos foram realizados nos softwares *Microsoft Excel versão 2017* e o *Bioestat 5.0*, considerando um limite de confiança igual ou superior a 95%.

5 RESULTADOS

5.1 Característica do lixiviado

As concentrações dos indicadores físico-químicos e seus teores de metais para as três amostras de lixiviado *in natura* analisadas neste estudo estão descritas na Tabela 5.

Tabela 5 – Concentrações dos indicadores físico-químicos e teores de metais do lixiviado do ASCG

		Unidades	A1 18/11/2020	A2 20/01/2021	A3 07/04/2021
Indicadores físico-químicos	pH	--	8,5	8,8	8,1
	AT	mg.L ⁻¹	6000	6125	5687,5
	NAT	mg.L ⁻¹	1890	2240	1407
	Cloretos	mg.L ⁻¹	6648,0	6498,0	5248,4
	DQO	mg.L ⁻¹	13497,3	9210,5	18562,9
	SVT	mg.L ⁻¹	6300	3500	6500
Metais	Alumínio (Al)	mg.L ⁻¹ Al	NA	0,64	0,39
	Chumbo (Pb)	mg.L ⁻¹ Pb	NA	< 0,01	< 0,01
	Cromo (Cr)	mg.L ⁻¹ Cr	NA	0,64	0,23
	Ferro (Fe)	mg.L ⁻¹ Fe	NA	1,16	0,23
	Manganês (Mn)	mg.L ⁻¹ Mn	NA	0,18	0,12
	Zinco (Zn)	mg.L ⁻¹ Zn	NA	0,15	0,12

Legenda: A1: amostra 1 de lixiviado; A2: amostra 2 de lixiviado; A3: amostra 3 de lixiviado. AT: Alcalinidade Total; NAT: Nitrogênio Amoniacal Total; DQO: Demanda Química de Oxigênio; SVT: Sólidos Voláteis Totais. NA: Não analisada.

Fonte: Autora (2021).

Na Tabela 5 observa-se que alguns indicadores (pH, AT, NAT e cloretos) e os metais (Al, Fe, Pb, Cr, Mn e Zn) tiveram suas concentrações reduzidas na amostra A3 de lixiviado. Esse comportamento pode estar associado a precipitação pluviométrica ocorrida em dias anteriores a coleta, fator responsável por promover a diluição do lixiviado, reduzindo, assim, a carga de poluentes (HOAI *et al.*, 2021).

Cabe acrescentar que as amostras A1 e A2 de lixiviado foram coletadas durante a estação seca da região, neste período, as precipitações acumuladas em 30 dias anteriores as coletas foram de 12,5 e 7,1 mm, respectivamente. Enquanto que, no período de coleta da amostra A3 de lixiviado, houve eventos de chuva durante todo o mês de março de 2021, totalizando uma precipitação acumulada de 81,9 mm (INMET, 2021).

Em se tratando dos indicadores DQO e do SVT, observa-se que suas as concentrações na amostra A3 de lixiviado, aumentaram, apresentando comportamento oposto aos demais indicadores. De acordo com Mavakala *et al.* (2016), o aumento na concentração de alguns

poluentes na estação chuvosa, a exemplo da DQO e do Carbono orgânico total (COT), deve-se ao carreamento de matéria orgânica solúvel do maciço de resíduos, observada principalmente nas primeiras horas de chuva. Então, esse fator pode ter sido a causa do aumento nas concentrações da DQO e do SVT mensuradas na amostra de lixiviado estudado.

Analisando individualmente cada indicador físico-químico, observa-se que os valores do pH nas amostras de lixiviado analisadas foram superiores a 8. Esse comportamento é característico de aterros que estão na fase metanogênica de biodegradação, pois o aumento do pH ocorre em virtude do consumo dos ácidos pelas bactérias metanogênicas, transformando-os em gás metano e CO₂ (KJELDSEN *et al.*, 2002). Apesar do lixiviado do ASCG apresentar os valores de pH dentro da faixa permitida para o lançamento do efluentes em corpo receptor (entre 5 e 9), conforme a Resolução CONAMA n.430 (BRASIL, 2011), no projeto inicial do aterro não é previsto seu lançamento. Além disso, como recomendando pela Resolução CONAMA n.430 (BRASIL, 2011), outros parâmetros devem ser avaliados para o lançamento de efluentes em corpos receptores.

Em termos da AT, indicador diretamente relacionada à decomposição bioquímica dos resíduos e aos processos de dissolução que ocorrem no interior do maciço (MAHAPATRA, 2011), observa-se teores que variaram de 5687 a 6000 mg.L⁻¹, faixa esperada para aterros com idade intermediária (5 a 10 anos), cuja concentrações são mais elevadas (ZIYANG *et al.*, 2009). Cabe acrescentar que elevados teores de alcalinidade resultam em um lixiviado altamente tamponado, impedindo, assim, a variação brusca do pH (MOOD e TOWNSEND, 2017), fato observado no presente estudo, em que os valores de pH variaram de 8,1 a 8,8.

Com relação ao nitrogênio amoniacal total, as concentrações encontradas no lixiviado foram de 1407 a 2240 mg.L⁻¹, cujo valor médio (1845,7 mg.L⁻¹) foi cerca de 92 vezes acima do máximo permitido (20 mg.L⁻¹) para o lançamento do efluente em corpos d'água receptores (BRASIL, 2011). O NAT é um dos indicadores que mais preocupam a gestão e o gerenciamento de lixiviados de aterros, em virtude do seu potencial tóxico ao meio ambiente e à saúde humana (MIAO *et al.*, 2019). Segundo Metcalf e Eddy (2013), o NAT constitui-se do somatório do NH₃ e NH₄⁺, sendo a amônia livre (NH₃), a forma mais tóxica. Essa toxicidade é dada em função da elevação do pH, em que, efluentes com pH básico tem sua toxicidade aumentada.

A toxicidade da amônia livre no corpo humano foi discutida por Dasarathy *et al.* (2017). Segundo os autores, embora o cérebro humano seja mais sensível, seus efeitos deletérios podem afetar várias células e órgãos, como os rins, pulmões e fígado. Além disso, elevadas concentrações de amônia em ambientes aquáticos elevam a quantidade de amônia

absorvida pela biota aquática, a exemplos dos peixes, causando danos aos tecidos celulares e a até mesmo a morte (KIM *et al.*, 2019). Por este motivo, o monitoramento ambiental de lixiviado de aterro sanitário deve ser eficiente, a fim evitar a contaminação recursos naturais, que conseqüentemente, causará danos à saúde humana.

Os teores de cloretos nas amostras de lixiviado analisadas oscilaram de 5248 a 6648 mg.L⁻¹, valores superiores aos mensurados por Kjeldsen *et al.* (2002). No entanto, cabe frisar que as concentrações de cloretos no lixiviado refletem a presença de sais solúveis contidos nos resíduos sólidos urbanos (NAVEEN *et al.*, 2017). Logo, a composição dos resíduos aterrados são os grandes influenciadores dessa variação. O monitoramento das concentrações de cloretos em lixiviado e em poços de água subterrânea, para fins de detecção de contaminação ambiental foi abordada por Mondelli *et al.* (2016). Segundo o estudo, apesar das baixas taxas de cloretos verificadas em águas subterrâneas, esse indicador comportar-se como íons traçadores de contaminação.

Em se tratando do indicador DQO, as amostras de lixiviado *in natura* analisadas apresentou valor médio de 13756,9 ± 4681,6 mg.L⁻¹, faixa esperada para aterros em atividade de operação (> 10000 mg.L⁻¹) (FOO e HAMEED, 2009). De acordo com a Tabela 5, observou-se, ainda, que houve variação entre as amostras, comportamento que tem sido influenciado principalmente pela precipitação, na estação chuvosa, e pela recirculação de lixiviado, prática comum neste aterro, na estação seca. Apesar da recirculação de lixiviado ser adotada como uma alternativa para o tratamento do lixiviado, principalmente, em aterros localizados em regiões áridas e semiáridas, a falta de controle dessa ação pode elevar as concentrações de poluentes no lixiviado gerado (CALABRÒ *et al.*, 2018).

Os sólidos voláteis totais apresentaram elevadas concentrações nas amostras A1 (6300 mg.L⁻¹) e A3 (6500 mg.L⁻¹) de lixiviado, apresentando uma redução significativa na amostra A2 (3500 mg.L⁻¹). Assim como a DQO, esse parâmetro sofre interferência da precipitação e da recirculação de lixiviado, devido estar relacionado diretamente com quantidade de matéria orgânica contida no efluente. Logo, as concentrações mensuradas neste estudo refletem indiretamente altos teores de matéria orgânica de fácil degradação no lixiviado *in natura* do ASCG.

No que se refere aos metais analisados, nas amostras A2 e A3 de lixiviado, foram determinados teores de 0,64 e 0,39; 0,64 e 0,23, 1,16 e 0,23; 0,18 e 0,12; 0,15 e 0,12 mg.L⁻¹ para Al, Cr, Fe, Mn e Zn, respectivamente. O metal chumbo em ambas as amostras apresentou valor < 0,01 mg.L⁻¹. Essas concentrações são consideradas baixas em relação a lixiviados de

aterros com poucos anos de operação (WDOWCZYK e PULIKOWSKA, 2020). No entanto, Hussein *et al.* (2019) também encontraram baixas concentrações de cromo (Cr), zinco (Zn), manganês (Mn) e chumbo (Pb) em aterros ativos. A baixa concentração de metais deve-se principalmente, ao pH do meio, pois quando esse indicador se encontra entre a neutralidade e a basicidade a grande maioria dos metais têm sua solubilidade reduzida (COSTA, ALFAIA e CAMPOS, 2019).

5.2 Ensaios ecotoxicológicos com minhocas

5.2.1 Ensaio de letalidade preliminar

Os resultados do ensaio preliminar de letalidade em minhocas *Eisenia andrei* para os oito tratamentos analisados neste estudo estão apresentados na Tabela 6. Cabe salientar que o tratamento T0, também chamado de amostra controle, foi realizado apenas para fins de comparação com os demais tratamentos, pois ele foi isento de contaminação com o lixiviado.

Tabela 6 - Letalidade do ensaio preliminar em minhocas *Eisenia andrei* expostas ao solo contaminado com lixiviado

Trat.	Conc. (%)	Conc. (mL.kg ⁻¹)	Total de indivíduos expostos	Nº de ind. mortos	% de mortes	Nº de ind. não encontrados
T0	0	0,0	20	0	0	-
T1	1	1,0	20	0	0	-
T2	5	5,2	20	0	0	1
T3	10	10,4	20	0	0	3
T4	25	26,0	20	1	5	1
T4	50	52,0	20	4	20	7
T6	75	78,0	20	20	100	-
T7	100	104,0	20	20	100	-

Legenda: Trat.:Tratamentos; Conc.(%): concentração do lixiviado diluída, em porcentagem; Conc. (mL.kg⁻¹): concentração de lixiviado para cada quilograma de massa seca de SAT; ind.: indivíduos.

Fonte: Autora (2021).

De modo geral, não foram observadas efeito letal aos organismos submetidos as menores concentrações. No entanto, os tratamentos com maiores concentrações de lixiviado causaram elevada letalidade. Analisando os tratamentos individualmente, observa-se que em os tratamentos T1, T2 e T3 apesar de não ter ocorrido morte as minhocas *Eisenia andrei*, alguns indivíduos não foram encontrados nos recipientes-teste dos T2 e T3. Possivelmente os organismos fugiram pelos furos dos recipientes devido, nesse ensaio, não ter sido utilizado TNT para vedar as tampas, configurando, assim, um comportamento de fuga. Apesar da fuga dos

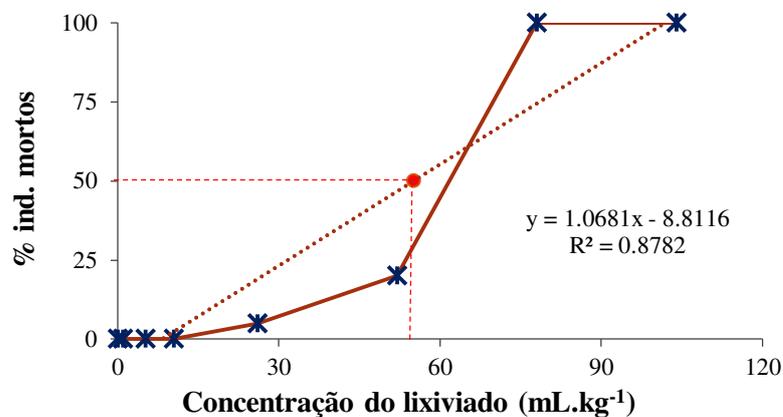
organismos ser um efeito que deve ser considerado em ensaios utilizando minhocas, neste ensaio, esse comportamento foi apenas observado.

A partir do tratamento T4 o solo contaminado com lixiviado causou morte as minhocas *Eiseina andrei* de modo que, no T4 foi verificado 1 morte e 1 dos indivíduos não foi encontrado; o T5 causou a morte de 4 indivíduos e 7 não foram encontrados do recipiente do ensaio; já as concentrações do T6 e T7 tiveram efeito letal em 100% dos organismos. Logo, pode-se observar que as minhocas *Eisenia andrei* não suportaram o efeito da contaminação quando o solo foi contaminado com lixiviado em concentrações superiores 75%.

Cabe frisar que a letalidade de todos os indivíduos nos tratamentos T6 e T7 ocorreram com apenas 72 h de ensaio. Então, nesse teste, as primeiras horas da exposição dos organismos em ambiente contaminado com lixiviado foram determinantes para sua sobrevivência.

Mediante os efeitos letais apresentados na Tabela 6 e por meio da regressão linear, a CL_{50} , concentração de lixiviado que causa 50% da morte dos indivíduos, foi de 53% (v/v) correspondendo a $55,06 \text{ mL.kg}^{-1}$ (v/p). A curva dose-resposta da letalidade dos organismos para a obtenção da CL_{50} está ilustrado na Figura 20.

Figura 20 - Curva dose-resposta do ensaio preliminar de letalidade em minhocas *Eisenia andrei* expostas ao solo contaminado com lixiviado



Fonte: Autora (2021).

Nota-se que a curva (Figura 20) teve formato de uma sigmoide, não se observando efeito na parte inicial, mas em seguida, observa-se um rápido efeito à medida em que a concentração aumenta. Salienta-se que a estimativa da CL_{50} , neste ensaio, foi essencial para determinar as concentrações de lixiviado que foram utilizadas nos ensaios definitivo e de fuga. Em relação a concentração de efeito não observado (CENO) e a concentração de efeito observado (CEO) seus valores corresponderam aos tratamentos T3 (10%) e T6 (75%), respectivamente.

Além da letalidade, foram observados os efeitos causados as minhocas *Eisenia andrei* durante e após o ensaio dentre eles: agitação, fuga do solo, mal cheiro nos recipientes-teste, deformações corporais, lentidão, corpo enrijecido e perda de massa corporal visível, apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Características observadas nas minhocas *Eisenia andrei* durante e após o ensaio preliminar de letalidade

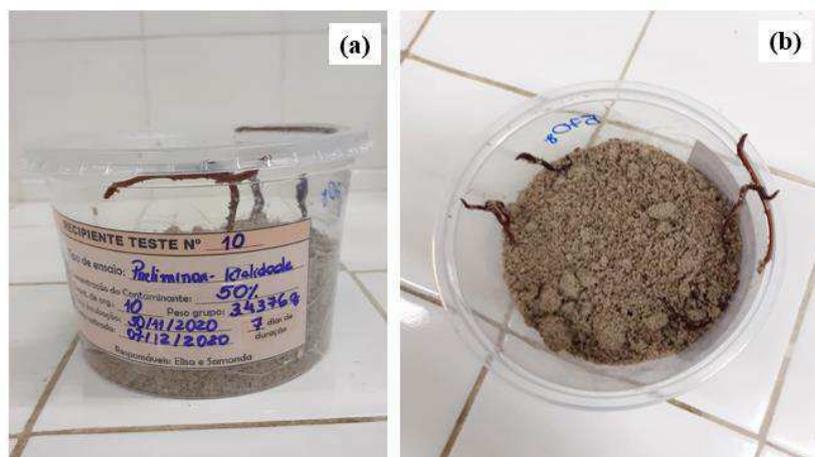
Trat.	Durante o ensaio		Pós-ensaio				
	Agitação	Fuga do solo	Mal cheiro no recipiente-teste	Deformações corporais	Lentidão	Corpo enrijecido	Perda de massa visível
T0	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
T1	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
T2	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
T3	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
T4	NO	NO	NO	x	x	x	NO
T5	x	x	NO	x	x	x	x
T6	x	x	x	x	NO	NO	x
T7	x	x	x	x	NO	NO	x

Legenda: NO: Efeito não observado; x: efeito observado.

Fonte: Autora (2021).

Analisando a Tabela 7, observa-se que durante o ensaio nos tratamentos T0, T1, T2, T3 e T4 não foram observadas agitação e nem evitamento dos organismos quando foram colocados no solo. No entanto, tais efeitos foram observados nos tratamentos T5, T6 e T7, como ilustrado na Figura 21(a, b) alguns organismos evitando o substrato-teste.

Figura 21- Organismos evitando o solo-teste

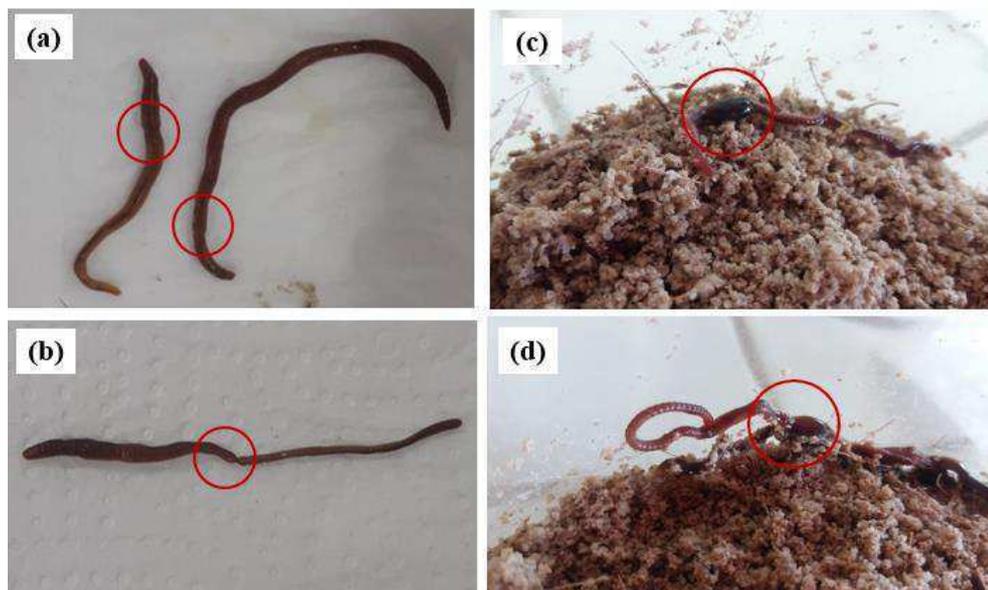


Fonte: Acervo de pesquisa (2021).

Após os sete dias do ensaio foi realizada a avaliação final do teste preliminar de letalidade, em que se observou mal cheiro em alguns recipientes-teste, e os organismos apresentavam deformações corporais, lentidão, enrijecimento no corpo e perda de biomassa visível. No entanto, essas características ocorreram nas concentrações $\geq 25\%$, correspondente ao tratamento T4, como mostra a Figura 22(a, b, c e d). Acrescenta-se que os tratamentos T6 e T7 foram mais agressivos aos organismos, sendo possível notar o inchaço do clitelo, estrutura glandular que auxilia a reprodução (Figura 22c), e o agrupamento dos organismos uns sobre os outros (Figura 22d).

Os efeitos causados da exposição de minhocas a contaminantes são adversos. O estudo de Gowri e Thangaraj (2020) observou anomalias nos espermatozoides, casulos defeituosos, além de anormalidades histopatológicas, como rupturas de tecido, ao expor diferentes espécies de minhocas a pesticida. Além disso, Di Carlo *et al.* (2020) associou o efeito de inchaço em algumas regiões dos corpos das minhocas como sendo uma resposta compensatória dos organismos para lidar com o estresse osmótico ocasionado pelo ambiente contaminado. Portanto, dependendo do grau de contaminação, a letalidade é um efeito posterior aos efeitos subletais.

Figura 22 - Características observadas nas minhocas *Eisenia andrei* após o ensaio preliminar de letalidade quando expostas em solo contaminado com lixiviado nas concentrações de (a) 25% (T4); (b) 50% (T5); (c) 75% (T6); (d) 100% (T7)



Fonte: Acervo de pesquisa (2021).

5.2.2 Ensaio de letalidade definitivo

Os resultados do ensaio definitivo de letalidade em minhocas *Eisenia andrei* expostas ao solo contaminado com lixiviado para os seis tratamentos testados, estão expressos na Tabela 8. Assim como no ensaio preliminar, o tratamento T0 foi feito apenas para fins de comparação com os demais tratamentos.

Tabela 8 - Letalidade do ensaio definitivo em minhocas *Eisenia andrei* expostas ao solo contaminado com lixiviado

Trat.	Conc. (%)	Conc. (mL.kg ⁻¹)	Nº de indivíduos expostos	Indivíduos mortos			Total de ind. mortos em 14 dias	% mortes 14 dias
				72 h	7 dias	14 dias		
T0	0	0,0	30	0	0	0	0	0,0
T1	20	20,8	30	0	0	0	0	0,0
T2	26	27,0	30	2	0	0	2	6,7
T3	34	35,2	30	5	1	0	6	20,0
T4	44	45,8	30	3	1	0	4	13,3
T5	57	59,4	30	21	2	0	23	76,7

Legenda: Trat.: Tratamentos; Conc. (%): concentração do lixiviado diluída, em porcentagem; Conc. (mL.kg⁻¹): concentração de lixiviado para cada quilograma de massa seca de SAT; ind.: indivíduos.

Fonte: Autora (2021).

Analisando a Tabela 8 observa-se que as menores concentrações de lixiviado testadas não causaram efeito acentuado na letalidade, sendo esse efeito mais visível nas concentrações mais elevadas.

O tratamento T1 (20%) não causou morte as minhocas *Eisenia andrei*, como também após os 14 dias de exposição, não foi identificadas características anormais nos indivíduos. No tratamento T2 (26%) as letalidades dos indivíduos ocorreram apenas nas primeiras 72 h de ensaio. O T3 (34%) causou letalidade em cinco organismos, nas primeiras 72 h, e em um organismo após 7 dias de ensaio, totalizando 6 mortes ao final do ensaio. Em todos os tratamentos entre 7º e o 14º dia não ocorreu efeito letal.

Nota-se ainda uma tendência de crescimento da letalidade do tratamento T1 ao T3, à medida em que se aumentou a concentração do contaminante disposto no solo. Em contrapartida, o T4 (44%) apresentou um comportamento não esperado, pois, apesar de haver o aumento da concentração do lixiviado, não causou efeitos letais mais elevados quando comparado ao T3 (34%). Logo, os organismos expostos ao T4 apresentaram maior resistência ao ambiente contaminado. Observou-se que nas primeiras 72 h do ensaio, no T4, ocorreu letalidade em 3 dos 30 organismos expostos e com 7 dias de ensaio, ocorreu mais uma morte,

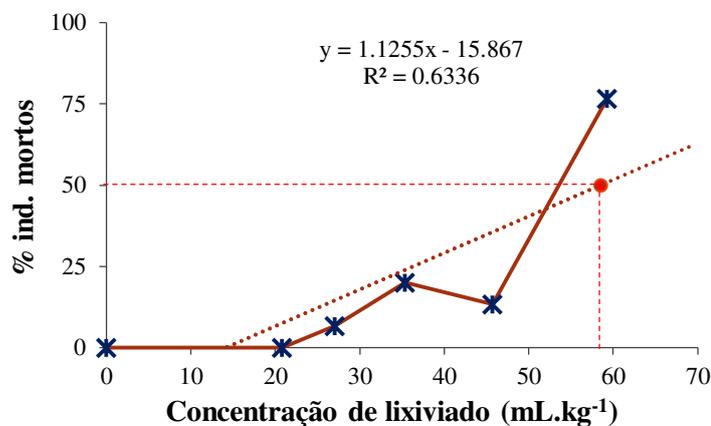
porém ao final do ensaio o número de organismos mortos manteve-se igual ao quantitativo de 7 dias.

No que se refere ao tratamento T5 (57%) foi observada uma porcentagem de morte bastante significativa. Em 72 h de ensaio o tratamento causou 70% da morte dos organismos (21 indivíduos) e passado o período de exposição de 7 dias foram observadas mais duas mortes, totalizando um percentual de morte de 76,7%, correspondendo a 23 organismos. Neste ensaio, assim como o preliminar, observou-se que as primeiras 72 h de exposição dos organismos em solo contaminado com lixiviado foram decisivas para sua sobrevivência, uma vez que, a maior letalidade ocorreu nas primeiras horas de exposição.

Analisando os dados, por meio da ANOVA foi verificada diferença estatística, em relação ao quantitativo de organismos mortos, apenas entre os tratamentos T4 e T5 e entre o T3 e T5. De modo, que nos demais tratamentos não houve diferença estatística no efeito letal causado aos indivíduos. Apesar disso, a letalidade em cada tratamento é um efeito que deve ser considerado, mesmo que não seja considerado estatisticamente como efeito significativo, pois, geralmente, nas menores concentrações os organismos não respondem ao efeito tóxico do contaminante (SOUSA e NIVA, 2019).

Em relação a curva dose-resposta (Figura 23), observa-se que a curva não apresentou o formato de uma sigmoide como no teste preliminar. Entretanto, foi possível verificar o efeito crescente de letalidade à medida em que ocorre o aumento das concentrações. Sendo assim, a estimativa da CL_{50} foi de $58,5 \text{ mL.kg}^{-1}$ (v/p), correspondendo a concentração em v/v de 56%.

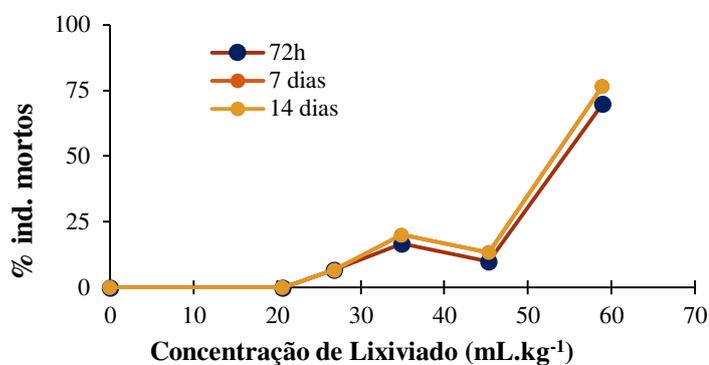
Figura 23 - Curva dose-resposta do ensaio definitivo da letalidade em minhocas *Eisenia andrei* após 14 dias de exposição ao solo contaminado com lixiviado



Fonte: Autora (2021).

Devido não haver diferença entre a quantidade de organismos mortos em 7 e em 14 dias as curvas dose-resposta tiverem o mesmo comportamento, apresentando igual valor da CL_{50} ($CL_{50-7\text{dias}} = CL_{50-14\text{dias}}$). Portanto, o período de exposição dos organismos por 14 dias não causou danos maiores em termos de letalidade. No entanto, nas primeiras 72 h houve menos mortes que as observadas em 7 e em 14 dias, sendo assim, a estimativa da CL_{50-72h} foi de $63,87 \text{ mL.kg}^{-1}$ (v/p), correspondendo a concentração de 61% (v/v). Na Figura 24, observa-se a curva dose-reposta nos três períodos de exposição ao solo contaminado com lixiviado.

Figura 24 - Curva dose-resposta do ensaio definitivo de letalidade em minhocas *Eisenia andrei* após 72 h, 7 e 14 dias de exposição ao solo contaminado com lixiviado



Fonte: Autora (2021).

Com relação a perda de umidade nos recipientes-teste durante os 14 dias de ensaio, a perda média diária entre os tratamentos foi de $1,1 \pm 0,12 \text{ g}$, a redução da umidade pode estar associada aos furos existentes nas tampas dos recipientes, os quais permitem as trocas gasosas.

Ainda foram observadas as alterações no pH durante o teste, a Tabela 9 apresenta esses valores. Tal variação ainda pode ser observada na Figura 25.

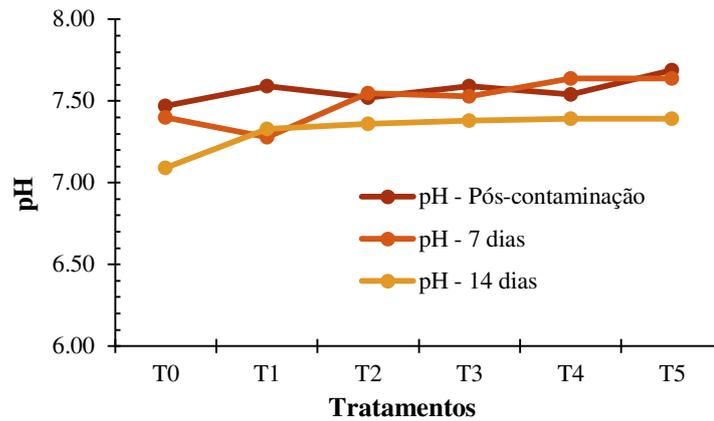
Tabela 9 - Valores do pH do solo no ensaio definitivo de letalidade

Trat.	Conc. (%)	Conc. (mL.kg ⁻¹)	pH - Pós-contaminação Dia zero	pH - 7 dias	pH - 14 dias
T0	0	0,0	7,47	7,40	7,09
T1	20	20,8	7,59	7,28	7,33
T2	26	27,0	7,52	7,55	7,36
T3	34	35,2	7,59	7,53	7,38
T4	44	45,8	7,54	7,64	7,39
T5	57	59,4	7,69	7,64	7,39

Legenda: Trat.: Tratamentos; Conc. (%): concentração do lixiviado diluída em porcentagem; Conc. (mL.kg⁻¹): concentração de lixiviado para cada quilograma de massa seca de SAT.

Fonte: Autora (2021).

Figura 25 - Variação nos valores pH do solo no ensaio definitivo de letalidade

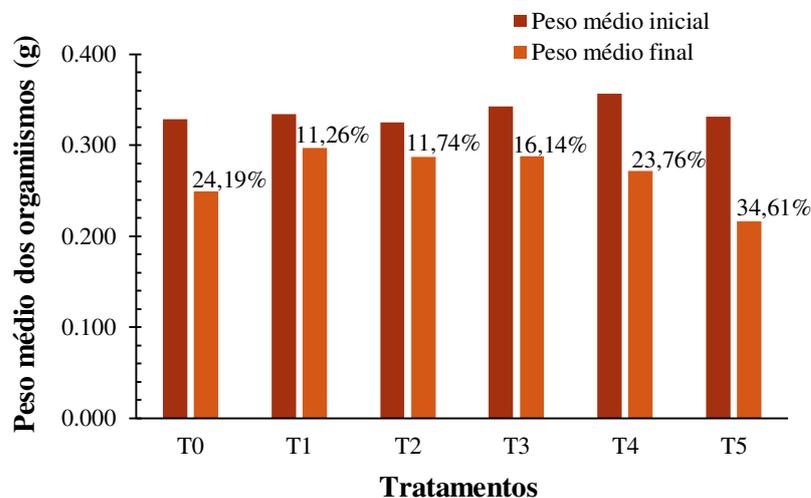


Fonte: Autora (2021).

Na Tabela 9, observa-se que após os 14 dias de ensaio houve uma leve redução do pH do solo nos recipientes-teste. Essa redução, entre o pH pós-contaminação (dia zero) e o pH de 14 dias, foi comprovada pela análise estatística ANOVA (p -valor < 0,05). No entanto, não houve diferença estatística entre o pH pós-contaminação (dia zero) e o pH em 7 dias. Portanto, a redução do pH pode ter sido influenciada pelos organismos presentes no solo, pois as minhocas são espécies que conseguem alterar suas propriedades físicas e químicas causadas pelos seus deslocamentos e pelo trânsito intestinal da matéria orgânica (SINGH *et al.*, 2016).

Em relação a perda de biomassa das minhocas *Eisenia andrei*, após os 14 dias de ensaio observou-se a redução do peso em todos os tratamentos, sendo o T5 o que causou maior redução da biomassa nos indivíduos, cerca de 35% (Figura 26). Cabe acrescentar que todas as reduções foram estatisticamente significativas (p -valor < 0,05), como pode ser observado na Tabela 10.

Figura 26 - Perda de biomassa das minhocas *Eisenia andrei* após os 14 dias do ensaio de letalidade



Fonte: Autora (2021).

Tabela 10 - Valores dos *p*-valores obtidos pelo teste ANOVA quando comparado os pesos dos indivíduos antes e após o ensaio definitivo de letalidade

Trat.	Conc. (%)	Conc. (mL.kg ⁻¹)	<i>p</i> -valor
T0	0	0,00	0,0019
T1	20	20,8	0,0145
T2	26	27,0	0,0043
T3	34	35,2	0,0007
T4	44	45,8	0,0013
T5	57	59,4	0,0034

Legenda: Trat.: Tratamentos; Conc. (%): concentração do lixiviado diluída em porcentagem; Conc. (mL.kg⁻¹): concentração de lixiviado para cada quilograma de massa seca de SAT.

Fonte: Autora (2021).

Ainda na Figura 26, observa-se que o tratamento T0, apesar de ser isento de contaminação, causou maior redução de peso quando comparado aos tratamentos T1, T2, T3 e T4. Esse efeito está associado à composição do lixiviado, pois sua maior parcela é constituída de matéria orgânica dissolvida, fonte de alimentação das minhocas. Em vista disso, os organismos podem ter consumido parte dos componentes dissolvidos no solo, impedindo uma maior perda de biomassa quando comparada ao solo sem contaminação e sem nutriente.

Durante e após o ensaio definitivo de letalidade algumas características foram observadas nos organismos expostos, tais como agitação, fuga do solo, mau cheiro nos recipientes-teste, deformações corporais, lentidão/agitação, corpo enrijecido/ amolecido e perda de massa visível, conforme ilustrada na Tabela 11. Observa-se que as menores concentrações de lixiviado não causaram efeitos aos organismos, comportamento similar ao encontrado no ensaio preliminar de letalidade.

Tabela 11 - Características observadas nas minhocas *Eisenia andrei* durante e após o ensaio definitivo de letalidade

Trat.	Durante o ensaio		Pós-ensaio (14 dias)				
	Agitação	Fuga do solo	Mal cheiro recip. teste	Deformações corporais	Lentidão /agitação	Corpo enrijecido/a molecido	Perda de massa visível
T0	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
T1	NO	NO	NO	NO	x	NO	NO
T2	x	NO	NO	x	x	NO	x
T3	x	x	NO	x	x	NO	x
T4	x	x	x	x	x	x	x
T5	x	x	x	x	x	x	x

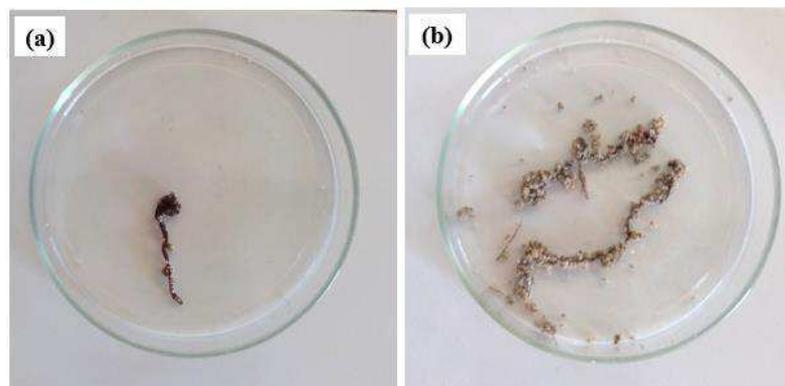
Legenda: Trat.: Tratamentos; NO: Efeito não observado; x: efeito observado.

Fonte: Autora (2021).

Analisando a Tabela 11, nota-se que a partir do T2 os organismos quando colocados ao solo contaminado com lixiviado apresentaram comportamento de agitação e a partir do T3, os organismos tentaram fugir pelas paredes dos recipientes-teste, como também observado no ensaio preliminar de letalidade (Figura 21,a e Figura 21,b). Devido ao período de exposição desse ensaio ser maior que o preliminar, notou-se que as menores concentrações causaram alterações nos organismos, como a lentidão ou agitação, observada a partir do tratamento T1. Nos tratamentos T2 e T3, além das alterações no comportamento, foram observadas deformações corporais e perda de biomassa visível. Os tratamentos T4 e T5 foram mais agressivos aos organismos, ao ponto de serem identificadas todas as características listadas na Tabela 11. Cabe salientar que os organismos que sobreviveram ao ensaio não apresentaram deformações corporais visíveis, havendo apenas mudanças comportamentais como agitação ou lentidão.

As Figuras 27, 28 e 29 mostram os efeitos do solo contaminado com lixiviado sobre as minhocas *Eisenia andrei* nos diferentes tratamentos do ensaio definitivo de letalidade.

Figura 27 - Efeito do solo contaminado com lixiviado sobre os organismos nos tratamentos (a) T2 e (b) T3



Fonte: Autora (2021).

Figura 28 - Efeito do solo contaminado com lixiviado sobre os organismos no tratamento T4



Fonte: Autora (2021).

Figura 29 - Efeito do solo contaminado com lixiviado sobre os organismos no tratamento T5



Fonte: Autora (2021).

Observa-se que no tratamento T5 (Figura 29) a maioria dos organismos mortos estavam na parte superior do solo, sugerindo que os organismos não conseguiram penetra no solo contaminado, vindo a óbito ainda na superfície. Uma outra característica observada foi o agrupamento dos organismos, uns sobre os outros, e a quantidade de solo contida sobre sua pele, características de comportamento de agitação e estresse.

5.2.3 Ensaio de recontaminação

Os resultados quanto ao ganho e perda de peso dos organismos sobreviventes do Ensaio Definitivo de Letalidade (EDL), quando colocados em novo alimento, e sua variação de massa após a segunda contaminação, denominado nesse estudo de Recontaminação (REC), estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 - Peso médio dos organismos expostos ao ensaio de recontaminação

Trat.	Conc. (%)	Conc. (mL.kg ⁻¹)	Nº. org. expostos	Peso médio dos organismos (g)				
				Após EDL	Após Alimentação	Após aclimatação	REC 7 dias	REC 14 dias
T0	0	0,0	18	0,2485	0,4259	0,3325	0,2765	0,2170
T1	20	20,8	20	0,2965	0,4117	0,3302	0,3005	0,2736
T2	26	27,0	19	0,2715	0,3717	0,3300	0,2865	0,2619
T3	34	35,2	18	0,2865	0,3965	0,3121	0,3100	0,2736
T4	44	45,8	18	0,2774	0,3761	0,3023	0,2685	0,2536

Legenda: Trat.: Tratamentos; Conc. (%): concentração do lixiviado diluída em porcentagem; Conc. (mL.kg⁻¹): concentração de lixiviado para cada quilograma de massa seca de SAT; Após EDL: Peso dos após o ensaio definitivo de letalidade; Após alimentação: Peso dos organismos após 6 dias em alimento; Após aclimatação: Peso dos organismos após 24 h em SAT para purgar o intestino; REC – 7 dias: Peso dos organismos após 7 dias do ensaio de recontaminação. REC – 14 dias: Peso dos organismos após 14 dias do ensaio de recontaminação, ou seja, no final do ensaio.

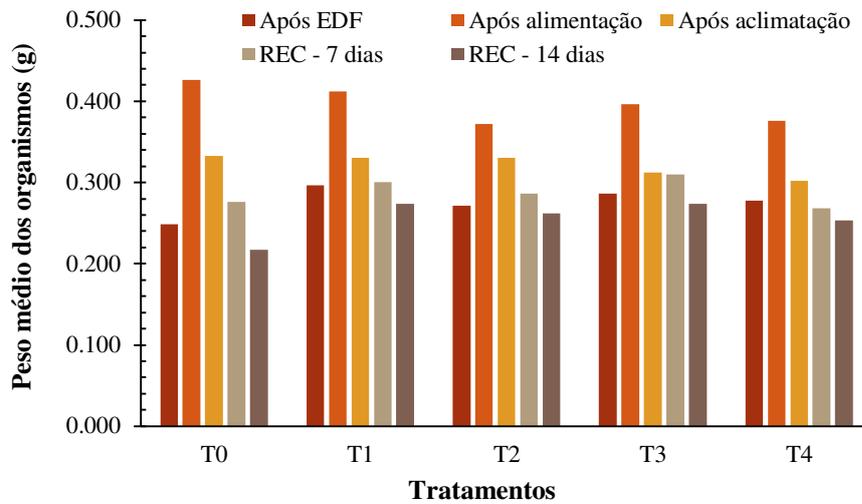
Fonte: Autora (2021).

Observa-se, Tabela 12, que os organismos após o ensaio definitivo de letalidade tiveram uma perda considerável de massa corpórea, como abordado na subseção 5.2.2, cujos pesos médios foram inferiores a 0,300 gramas. No entanto, quando deixados em alimento novo por 6 dias foi observado um elevado ganho de massa. O tratamento T0, por exemplo, teve um ganho de aproximadamente 70%, e os demais tratamentos, o aumento de peso variou de 35 a 39%.

Após a aclimação e o ensaio de recontaminação notou-se uma redução no peso dos organismos. A aclimação de 24 h reduziu o peso dos organismos entre 19 e 22% e quando colocados novamente em ambiente contaminado, em 7 dias observou-se uma perda média de peso de $11,26 \pm 6,13\%$ e em 14 dias de $21,44 \pm 10,02\%$.

Uma característica relevante observada neste ensaio foi a perda e ganho de peso do tratamento T0. Apesar desse tratamento apresentar maior ganho de peso durante a alimentação, e maior peso médio após a aclimação, observou-se que após o ensaio de recontaminação, o qual foi deixado em solo controle sem a adição de contaminante, a perda de massa foi significativa, cerca de 38%, sendo a mais elevada entre os tratamentos. Visto que, os demais tratamentos apresentaram perda média de 17,21%. Esse comportamento também foi observado na subseção 5.2.2. Cabe acrescentar que devido o tratamento T0 ser isento de contaminação por lixiviado, então, o solo controle não contém nenhuma fonte de alimentação aos organismos, por isso que foi observada uma perda de massa mais significativa. Esse efeito de redução da biomassa nos organismos do solo-controle também foi registrado no estudo de Soroldoni *et al.* (2019), cuja perda foi de aproximadamente 48% após 56 dias de exposição. Para melhor visualizar a variação do peso das minhocas *Eisenia andrei* em cada uma das etapas de exposição, a Figura 30 melhor representa esse comportamento.

Figura 30 - Peso médio dos organismos exposto a recontaminação



Legenda: Após EDF: Peso dos após o ensaio definitivo de letalidade; Após alimentação: Peso dos organismos após 6 dias em alimento; Após aclimação: Peso dos organismos após 24 h em SAT para purgar o intestino; REC - 7 dias: Peso dos organismos após 7 dias do ensaio de recontaminação. REC - 14 dias: Peso dos organismos após 14 dias do ensaio de recontaminação, ou seja, no final do ensaio.

Fonte: Autora (2021).

Uma abordagem similar a este estudo foi realizada por Žaltauskaitė e Kniuipytė (2020) ao expor minhocas da espécie *Eisenia fétida* por 4 semanas em solo contaminado com chumbo (Pb), nas concentrações de 40, 250, 500, 1000 e 2500 mgPb.kg⁻¹, e posteriormente, por igual período, os indivíduos foram colocados em solo sem contaminação, a fim de observar a recuperação. Os autores concluíram que embora as minhocas não tenham conseguido recuperar completamente seu crescimento, os organismos expostos em baixas concentrações de Pb apresentaram potencial de recuperação de crescimento e diminuição das bioconcentrações. No entanto, segundo os autores, para haver a recuperação total dos indivíduos após uma contaminação é necessário avaliar os danos genéticos dos organismos à medida em que permanecem em ambiente de recuperação.

Nesse ensaio ainda foi possível observar as alterações nos valores do pH do solo-teste, como pode ser visto na Tabela 13.

Tabela 13 - Valores do pH do solo no ensaio de recontaminação

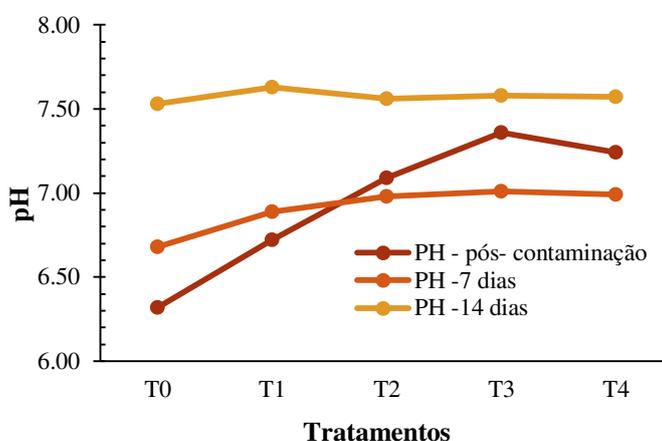
Trat.	Conc. (%)	Conc. (mL.kg ⁻¹)	pH – Pós-contaminação Dia zero	pH - 7 dias	pH - 14 dias
T0	0	0,0	6,32	6,68	7,53
T1	20	20,8	6,72	6,89	7,63
T2	26	27,0	7,09	6,98	7,56
T3	34	35,2	7,36	7,01	7,58
T4	57	59,4	7,24	6,99	7,57

Legenda: Trat.: Tratamentos; Conc. (%): concentração do lixiviado diluída, em porcentagem; Conc. (mL.kg⁻¹): concentração de lixiviado para cada quilograma de massa seca de SAT.

Fonte: Autora (2021).

Devido ao pH do contaminante ser superior a 8, então à medida em que foi aumentado a concentração do lixiviado no solo-teste, houve o aumento nos valores do pH. Assim, após a contaminação do solo, os valores do pH variaram de 6,32 a 7,24, sendo o menor valor referente ao solo-controle. Em 7 dias de ensaio observou-se que nos tratamentos T0 e T1 houve aumento no valor do pH e nos tratamentos T2, T3 e T4 houve redução. Notou-se ainda (Figura 31) uma tendência de estabilização nos valores do pH do solo ao 7º dia de ensaio, em todos os tratamentos. Ao final do ensaio, no 14º dia, os valores do pH do solo aumentaram em relação ao 7º dia, de modo que o valor médio entre os tratamentos foi de $7,57 \pm 0,03$. Portanto, observa-se que os organismos, presentes no solo, conseguiram equilibrar os valores do pH, tanto no solo-controle como nos solos-teste. Comportamento similar foi identificado por Singh, Singh e Vig (2016), em que as minhocas estabilizaram o valor do pH em solo contaminados com cinzas volantes de usinas termoeletricas.

Figura 31- Variação do pH do solo no ensaio de recontaminação



Fonte: Autora (2021).

Comparando o efeito do pH do EDL e no ensaio de recontaminação, observa-se que no EDL, os valores o pH do solo-teste se encontravam numa faixa maior ($7,56 \pm 0,07$) (média \pm desvio padrão) e após do 14 dias, observou uma redução, cujo valor médio foi de $7,32 \pm 0,11$. Devido aos valores já estarem na faixa ideal para os organismos, então, não foi observada mudanças significativas. Porém, durante o ensaio de recontaminação foi possível melhor visualizar as modificações causadas pelos organismos no pH do solo, em que, com o passar dos dias, notou-se uma estabilização em seus valores, apresentando um comportamento visualmente linear entre os tratamentos (Figura 31).

Em relação a letalidade nos organismos quando expostos ao ensaio de recontaminação, notou-se uma maior resistência ao contaminante, não sendo observada elevada taxa de letalidade (Tabela 14).

Tabela 14 - Letalidade do ensaio de recontaminação em minhocas *Eisenia andrei* expostas ao solo contaminado com lixiviado

Trat.	Conc. (%)	Conc. (mL.kg ⁻¹)	Nº de indivíduos expostos	Nº Indivíduos mortos			Total de ind. mortos em 14 dias	% mortes 14 dias
				72 h	7 dias	14 dias		
T0	0	0,0	18	0	1	0	1	6%
T1	20	20,8	20	0	0	0	0	0%
T2	26	27,0	19	0	0	0	0	0%
T3	34	35,2	18	1	0	0	1	6%
T4	44	45,8	18	3	1	0	4	22%

Legenda: Trat.: Tratamentos; Conc. (%): concentração do lixiviado diluída em porcentagem; Conc. (mL.kg⁻¹): concentração de lixiviado para cada quilograma de massa seca de SAT; ind.: indivíduos.

Fonte: Autora (2021).

No tratamento T0 foi observado uma morte, representando 6% do quantitativo dos indivíduos expostos. A perda de biomassa desse tratamento foi um indicativo de que o ambiente estava desfavorável para os organismos, logo, a morte de 1 indivíduo pode estar associada a falta de alimento para a sobrevivência. Os tratamentos T1 e T2 não causaram morte aos organismos e no T3 houve o registro de apenas um indivíduo morto. O efeito letal foi mais acentuado no último tratamento, o T4, causando a morte de 4 indivíduos, cerca de 22% dos organismos expostos.

Assim como nos ensaios preliminar e definitivo de letalidade, as primeiras horas de exposição causaram maiores efeitos letais aos organismos. Além disso, também não foram observadas aumento na taxa de letalidade entre o 7º e 14º dia de ensaio.

Por meio deste ensaio foi possível notar que uma segunda exposição dos organismos em solo sem alimento causou efeitos negativos as minhocas *Eisenia andrei*, como a perda de

biomassa e até mesmo a morte. No entanto, os tratamentos cujas concentrações do contaminante no solo foram baixas, os organismos conseguiram manter-se vivos, evitando a elevada perda de massa. Isso pode ter sido influenciada pela própria origem do contaminante, o qual possui elevada concentração de matéria orgânica, contudo, nas maiores concentrações observou-se efeito letal mais acentuado.

Confrontando esse resultado com o ensaio definitivo de letalidade (EDL), nota-se que o tratamento T3 no EDL causou a morte de 16,67% dos organismos, já no ensaio de recontaminação houve apenas 6% de letalidade, mostrando uma maior resistência dos organismos sobreviventes a primeira contaminação. Porém, o tratamento T4 que havia causado apenas 10% de morte no EDL, neste ensaio levou a óbito 22% dos indivíduos. Portanto, este ensaio mostra que os organismos, mesmo que da mesma espécie, possuem efeitos individuais diferentes.

Em relação aos efeitos provocados aos organismos nessa segunda exposição, em solo contaminado com lixiviado, observou-se efeitos similares ao EDL, Tabela 15.

Tabela 15 - Características observadas nas minhocas *Eisenia andrei* durante e após o ensaio de recontaminação

Trat.	Durante o ensaio		Pós-ensaio (14 dias)				
	Agitação	Fuga do solo	Mal cheiro recip. teste	Deformações corporais	Lentidão /agitação	Corpo enrijecido/a molecido	Perda de massa visível
T0	NO	NO	NO	x	x	x	x
T1	NO	NO	NO	NO	x	NO	NO
T2	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
T3	x	x	x	x	x	x	x
T4	x	x	x	x	x	x	x

Legenda: Trat.: Tratamentos; NO: Efeito não observado; x: efeito observado.

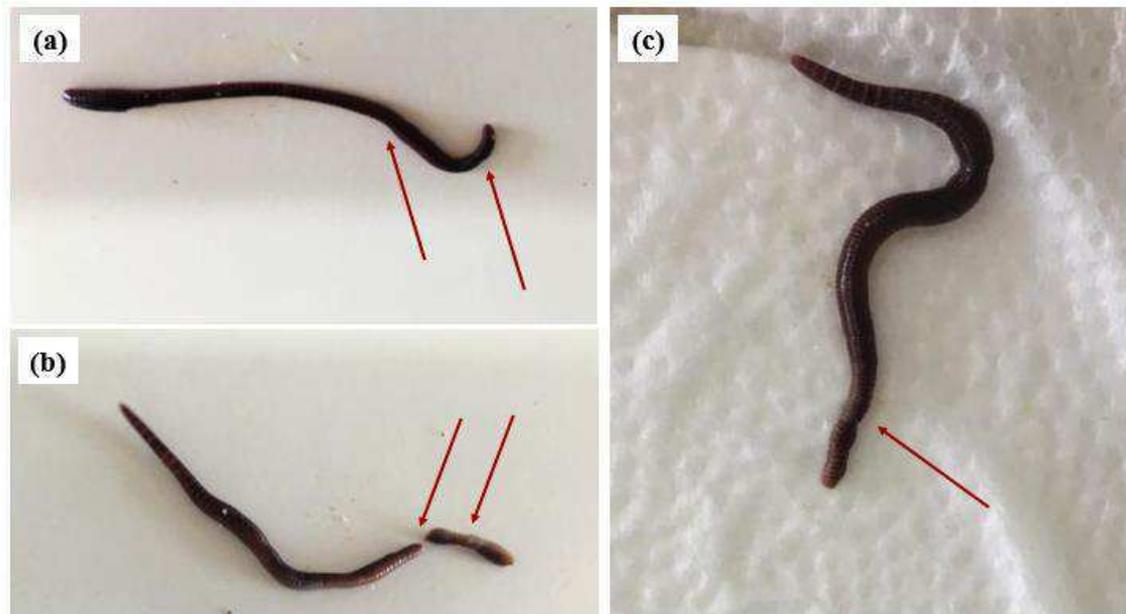
Fonte: Autora (2021).

A partir do tratamento T3 (34%), constatou-se deformações no corpo das minhocas *Eisenia andrei*, sendo observados ainda mudanças no comportamento como retardo (lentidão) e agitação. Além disso, no tratamento T0, foram observadas deformações corporais, lentidão e corpo amolecido, comportamentos não identificados no EDL.

Os tratamentos T3 e T4 foram responsáveis por causar maiores efeitos adversos aos organismos que permaneceram vivos durante o período do teste. Alguns deles, quando retirados do solo contaminado com lixiviado para a pesagem, estavam agitados e expeliam excreção intestinal em excesso, além disso, foi possível registrar o momento da automutilação (Figura

32 (a, b, c)) de alguns organismos. Esses comportamentos podem estar ligados ao acúmulo de contaminantes no corpo dos indivíduos (Soroldoni *et al.* 2019).

Figura 32 - Efeitos físicos causados ao corpo das minhocas *Eisenia andrei*: (a e c) início da automutilação e (b) após fragmentação do corpo.



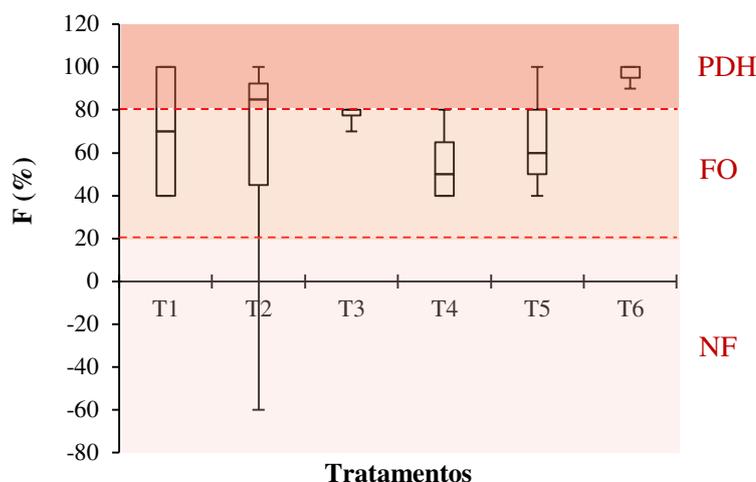
Fonte: Autora (2020).

De acordo com Pereira *et al.* (2020), a letalidade nem sempre é um resultado imediato, pois, inicialmente os organismos respondem ao efeito do contaminante apresentando anomalias morfológicas, no entanto, posteriormente, os compostos podem comprometer a saúde das minhocas e levar à morte, devido a períodos mais longos de exposição acarretado pelos danos cumulativos em seus sistemas.

5.2.4 Ensaio comportamental de fuga

Os resultados do ensaio comportamental de fuga de minhocas *Eisenia andrei* em solo artificial tropical contaminado com lixiviado nas concentrações de 10,0; 14,0; 19,6; 27,4; 38,4; e 53,8% (v/v), correspondente aos tratamentos T1, T2, T3, T4, T5 e T6, respectivamente, estão apresentados na Figura 33 e Tabela 16.

Figura 33 - Percentuais de fuga dos organismos em solo contaminado com lixiviado.



Legenda: F: Percentual de fuga dos organismos; NF: Faixa de concentração em que não se observa o efeito de fuga dos organismos, $F < 20\%$; FO: Faixa em que se observa efeito de fuga, $20 \leq F < 80$; PDH: Faixa de concentração em que se observa a perda de habitat, $F \geq 80\%$. Fonte: Autora (2021).

Tabela 16 - Percentuais médio de fuga dos organismos em solo contaminado com lixiviado

Tratamentos	Conc. (%)	Conc. (mL.kg ⁻¹)	F (%)	Resposta de fuga
T1	10,0	10,38	70	Observada
T2	14,0	14,53	68	Observada
T3	19,6	20,34	78	Observada
T4	27,4	28,47	55	Observada
T5	38,4	39,86	67	Observada
T6	53,8	55,80	97	Perda de habitat

Legenda: Conc. (%): concentração do lixiviado diluída, em porcentagem; Conc. (mL.kg⁻¹): concentração de lixiviado para cada quilograma de massa seca de SAT; F: Fuga média por tratamento, expressa em porcentagem. Fonte: Autora (2021).

Na Figura 33, observa-se a variação do percentual do efeito de fuga em cada um dos tratamentos. De modo geral, o lixiviado causou perturbações no comportamento dos organismos em todos os tratamentos, uma vez que, a média da fuga das minhocas *Eisenia andrei* foi de $69,72 \pm 16,20\%$ (média \pm desvio padrão). Além disso, notou-se que alguns tratamentos causaram efeitos diferentes entre as suas réplicas, ocorrendo uma maior dispersão os dados, a exemplo do tratamento T2 (Figura 33).

Analisando individualmente os tratamentos, notou-se que o tratamento T1 apesar de conter a menor concentração de lixiviado no solo-teste, os organismos o rejeitaram e deslocaram-se para o solo-controle. Nesse tratamento, algumas réplicas causaram efeito de fuga ($20 \leq F < 80$) e em outras, houve a perda de habitat ($F \geq 80\%$), porém o percentual médio da fuga foi de 70%. Logo, no T1, obteve-se a resposta de efeito de fuga.

No tratamento T2, correspondente a concentração de 14% de lixiviado, foi observado diferentes comportamentos entre as réplicas, apresentando valores de F de -60 e 100%. O valor negativo ($F \leq 0$) encontrado nesse tratamento referiu-se ao efeito de fuga não observado em uma das suas réplicas. Tal comportamento significou que os organismos preferiram o solo-teste ao invés do solo-controle, não configurando a mudança no comportamento do organismo quando exposto ao contaminante. Apesar disso, a fuga média desse tratamento foi de 53%, caracterizando como tratamento cujo efeito de fuga foi observado.

Os tratamentos T3 e T4 obtiveram-se valores médios de fuga de 78 e 55%, respectivamente, e em todas as réplicas os valores de F estiveram entre 40 e 80%, assim, nesses tratamentos também foi observado o efeito de fuga. O tratamento T5 apresentou comportamento similar ao T1, em que algumas réplicas causaram efeito de fuga ($20\% \leq F < 80\%$) e em outras houve a perda de habitat ($F \geq 80\%$). Porém, o valor médio foi de 67%, caracterizando como efeito de fuga observado.

O tratamento T6, que contém 53,78% de lixiviado no solo, foi o único que apresentou fuga superior a 80% em todas as réplicas. O valor médio de fuga, nesse tratamento, foi de 97% configurando a perda de habitat ($F > 80\%$). Isso significa que a elevada concentração de lixiviado contida no solo-teste causou a evasão dos organismos para o solo-controle, em quase 100%. Logo, o lixiviado do ASCG, disposto em solo, em concentrações superiores a 54% (v/v) alteram significativamente o comportamento dos organismos, impedindo-os de permanecer no substrato. Concentração similar a essa foi encontrada por Sales Junior *et al.* (2021), em que o lixiviado de um aterro sanitário localizado no Rio de Janeiro, Brasil, quando disposto em solo natural causou a perda de habitat na concentração de 50% (v/v).

As alterações no comportamento dos organismos observadas neste estudo foram comprovadas pelo Teste de *Fisher*, o qual identificou que houve fuga significativa em todos os tratamentos quando comparada ao efeito de fuga não observada. As minhocas são organismos sensíveis a poluentes contidos no solo, então, dependendo da dose e do tempo de exposição ao contaminante, pode ocorrer mudanças de comportamento (LIU *et al.*, 2017; YANG *et al.*, 2018), como observado nos tratamentos investigados.

Diante dos efeitos observados neste estudo, o lixiviado não deve ser lançado sem tratamento adequado no meio ambiente, devido aos efeitos negativos na fauna edáfica. Conforme Lisboa *et al.*, (2021), efluentes lançados no solo sem um devido tratamento podem ocasionar o acúmulo de contaminantes ao longo das suas camadas, podendo alterar o

desenvolvimento biológico dos organismos, a exemplos das alterações comportamentais e os efeitos inibitórios na reprodução em minhocas.

Por meio desse teste comportamental de fuga ainda foi possível notar sua relação com o ensaio letalidade, pois, as concentrações de lixiviado disposto no solo que causaram perda de habitat (53,4%) e a estimativa da CL₅₀, (56%) tiveram valores aproximados. Logo, esses ensaios se complementam. Além disso, a fuga dos organismos foi um indicativo das maiores consequências que podem ocorrer as minhocas *Eisenia andrei* caso permaneçam em solo contaminado. Cabe salientar, que o ensaio de fuga na concentração de 54,4% de lixiviado não causou a morte dos organismos, devido sua evasão para o solo-controle.

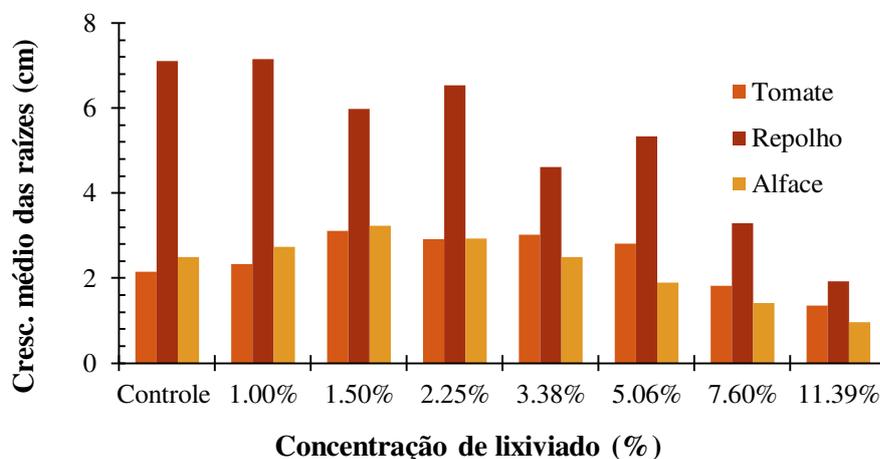
5.3 Teste de fitotoxicidade

Os resultados de fitotoxicidade foram divididas em cinco etapas: (i) crescimento médio das raízes; (ii) crescimento relativo da raiz; (iii) germinação relativa da semente; (iv) índice de germinação; (v) concentração efetiva de inibição de crescimento; e (vi) comparação entre o lixiviado fresco e preservado. Cada uma delas são apresentadas nas subseções de 5.3.1 a 5.3.6.

5.3.1 Crescimento das raízes

O crescimento médio das raízes das sementes de tomate, repolho e alface na amostra A2 de lixiviado pode ser observada na Figura 34. As concentrações de lixiviado de 1,00; 1,50; 2,25; 3,38; 5,06; 7,60 e 11,39%, correspondem aos tratamentos T1, T2, T3, T4, T5, T6 e T7, respectivamente, e o controle, representa a amostra em branco (sem contaminação).

Figura 34 - Crescimento médio das raízes das sementes exposta a amostra A2 de lixiviado



Fonte: Autora (2021).

Analisando a Figura 34, observa-se, que a semente de repolho teve maior crescimento das raízes em relação as demais sementes avaliadas em todos os tratamentos, apresentando variação de 1,93 a 7,16 cm, e, valores superiores a 6,5 cm nas concentrações de lixiviado de 1,00 e 2,25%. As sementes de tomate e alface tiveram crescimento das raízes menores, que variaram de 1,36 a 3,11 cm e de 0,96 a 3,23 cm, respectivamente.

Ainda na Figura 34, nota-se uma tendência de aumento no crescimento das raízes nos tratamentos T1 (1%) e T2 (1,5%) para as sementes de tomate e alface, e a partir da concentração de lixiviado de 2,25% observa-se uma estabilidade seguida de uma suave queda. Em contrapartida, o comportamento da semente de repolho tendeu ao decaimento à medida em que houve o aumento nos teores do contaminante. Porém, observa-se picos de crescimentos nos T3 (2,25%) e T5 (5,06%), o qual apresentaram crescimento das raízes maiores que nos tratamentos anteriores.

Analisando estatisticamente os dados da Figura 34, foi verificado que o crescimento da raiz na concentração de 1% (T1) de lixiviado, para a semente de tomate, não houve diferença estatística quando comparado ao crescimento nas concentrações de 2,25% e 7,60%. Portanto, a diluição dos poluentes contidos no T3 (2,25%) não estimulou significativamente o crescimento, de mesmo modo que o tratamento T6 (7,60%), que apesar de ter causado menor crescimento das raízes, não apresentou inibições significativa quando comparados com o tratamento T1 (1%).

Os tratamentos T2 (1,50%), T3 (2,25%), T4 (3,38%) e T5 (5,06%) não apresentaram diferença estatística de crescimento das raízes, logo, a espécie de tomate teve a mesma sensibilidade quando exposta as concentrações citadas. O tratamento T7 (11,39%) apresentou diferença significativa com todos os tratamentos devido ao crescimento reduzido. De modo geral, notou-se que as pequenas variações, para mais ou para menos, em termos de crescimento das raízes, não tiveram diferença estatística. Porém, as sementes responderam as pequenas variações, muitas vezes não identificadas como significativas nos testes estatísticos.

Em relação a semente de repolho, não foi verificada diferença estatística entre o tratamento T1 (1,00%) e os tratamentos de concentração 1,50 e 2,25% de lixiviado. De mesmo modo que, também, não foi verificada diferença entre o T5 (5,06%) e os T2 (1,50%), T3 (2,25%) e T4 (3,38%). Para a semente de alface, foi verificado que o tratamento T1 (1%) não apresentou diferença em crescimento quando comparado aos T2 (1,50%), T3 (2,25%) e T4 (3,38%), além disso, o tratamento T3 (2,25%) também não diferiu em relação ao T4 (3,38%).

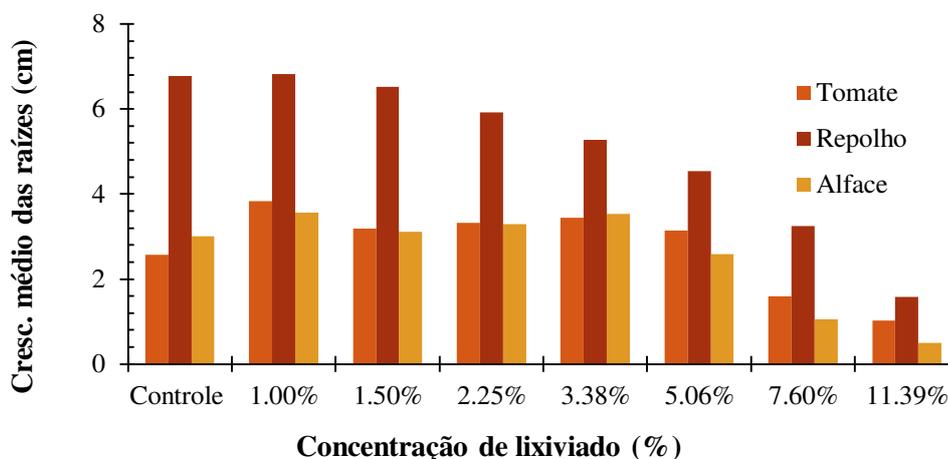
Já os tratamentos cujas concentrações de lixiviado foram $\geq 5\%$ tiveram diferença estatística quando comparada as demais.

Verificou-se ainda, que não houve diferença estatística entre os tratamentos T1 (1%) e T6 (7,60%) e o controle (branco) em termos de crescimento da raiz para a semente de tomate. Por meio desse comportamento pode-se inferir que a pequena concentração do tratamento T1 não causou alterações significativas no crescimento das raízes quando comparado ao controle. De mesmo modo que, a concentração de lixiviado no tratamento T6 não causou redução significativa na inibição do crescimento das raízes. Logo, o excesso de poluentes causou inibições no crescimento equivalentes à falta de nutrientes contidas nas concentrações inferiores.

Comparando crescimento das raízes do controle (branco) com os tratamentos da semente de repolho, observou-se que não houve diferença entre o branco e os três menores tratamentos, T1, T2 e T3. Já a semente de alface, os cinco menores tratamentos T1, T2, T3, T4 e T5 não diferiram em relação ao controle. Salienta-se que a ANOVA verifica se existe diferença estatística entre as amostras, a qual considera a média, a variância e a contagem. Logo, quando duas amostras não apresentam diferença estatística, não significa que são iguais, mas significa que tiveram estatisticamente o mesmo crescimento das raízes.

Em relação ao crescimento das raízes na amostra A3 de lixiviado, observa-se (Figura 35) um comportamento similar ao da amostra A2, no entanto, notou-se algumas características pouco diferentes. A semente de repolho teve uma redução em seu crescimento na medida em que se aumentava a concentração de lixiviado, não sendo observados picos, como na amostra A2. As sementes de tomate e alface tiveram o mesmo comportamento, em que após a concentração de 1% houve uma leve queda do crescimento, voltando a aumentar na concentração de 3,38% e em seguida apresentou uma queda mais acentuada nas concentrações maiores. Para essa amostra, as espécies estudadas variaram seu crescimento de 1,03 a 3,84 cm; 1,58 a 6,83 cm; e 0,50 a 3,56 cm, para as sementes de tomate, repolho e alface, respectivamente.

Figura 35 - Crescimento médio das raízes das sementes exposta a amostra A3 de lixiviado



Fonte: Autora (2021).

Verificando a diferença de crescimentos das raízes entre os tratamentos para cada uma das espécies, observou-se que a semente de tomate não diferiu estatisticamente entre os tratamentos T1 (1%) e os T2 (1,5%), T3 (2,25%) e T4 (3,38%). Os tratamentos T2 (1,5%), T3 (2,25%), T4 (3,38%) e T5 (5,06%) apresentaram crescimentos estatisticamente iguais, pois como se observa na Figura 35 há pouca variação entre eles. Em contrapartida, os T6 (7,60%) e T7 (11,39%) diferiram dos demais. A diferença de crescimento entre os tratamentos também foi realizada no estudo de Zulkepli *et al.* (2020), para os autores as concentrações de lixiviado testadas (3, 5, 10, 25, 50, 75 e 100% (v/v)) apresentaram crescimentos divergentes, porém, deve-se considerar que o espaçamento entre as concentrações foi maior, logo, é possível verificar mais claramente a diferença significativa entre os crescimentos.

Em relação a variação entre os tratamentos para a semente de repolho, verificou-se que os tratamentos T1 (1%) e o T2 (1,5%) não houveram diferença estatística entre si. O T3 (2,25%) foi estatisticamente semelhante aos T1 (1%), T2 (1,5%) T4 (3,38%). Além disso o T4 (3,38%) não teve diferença com o T5 (5,06%). A semente de alface apresentou crescimento estatisticamente semelhantes em seus cinco primeiros tratamentos, T1 (1%), T2 (1,5%), T3 (2,25%), T4 (3,38%) e T5 (5,06%), exceto quando comparado isoladamente os tratamentos T1 com o T5.

De modo geral, o aumento da concentração do contaminante na amostra A3 não causou alterações significativas nas sementes estudadas, de modo que apenas nas concentrações superiores foi identificado uma maior inibição ao crescimento.

Comparando o crescimento dos tratamentos da amostra A3 de lixiviado em relação ao controle (branco) foi verificado por meio da ANOVA que a semente de tomate não diferiu em

relação ao branco nos tratamentos T2 e T5, bem como, a semente de repolho nos tratamentos T1, T2 e T3 e a semente de alface nos cinco primeiros tratamentos (T1, T2 e T3, T4 e T5) também não houve diferença estatística em relação ao branco.

Analisando a sensibilidade das três sementes estudadas, para cada um dos tratamentos, a análise estatística ANOVA comprovou que houve diferença significativa de crescimento das raízes entre as espécies em ambas as amostras de lixiviado. Assim, as sementes de tomate, repolho e alface apresentaram crescimento diferentes quando expostas a mesma concentração do contaminante, tanto para a amostra A2 como para a A3 de lixiviado. Comportamento similar a esse foi discutido por Klauck, Rodrigues e Silva (2015), em que os autores verificaram que as sementes de alface, cebola e rúcula apresentaram sensibilidades diferentes quando expostas ao lixiviado de aterro sanitário. Por este motivo é importante testar mais de uma espécie, uma vez que, podem apresentar comportamentos diferentes, como identificado nesse estudo.

No entanto, quando comparado o crescimento das raízes das espécies estudadas duas a duas, percebeu-se que as sementes de tomate e alface apresentaram semelhanças entre si, como pode observado nas Figura 34 e Figura 35. Na amostra A2 as espécies não diferiram nos tratamentos T1(1%) e no T2 (1,50%) e na amostra A3, as sementes apresentaram crescimento estatisticamente iguais em seis dos sete tratamentos, havendo diferença estatística apenas no T6 (7,60%). Logo, pode-se inferir que as sementes têm sensibilidade de crescimento equivalentes quando exposta ao lixiviado.

Em relação a diferença do crescimento das raízes entre as amostras estudadas, notou-se, de modo geral, que as sementes de tomate, repolho e alface tiveram o mesmo crescimento quando expostas a amostras A2 e A3 de lixiviado. No entanto, para a semente de tomate foi verificada diferença entre os tratamentos T1 (1%) e T7 (11,38%) e a semente de alface apresentou crescimento diferentes nos tratamentos T4 (3,38%) e T5 (5,06%). Já a semente de repolho apresentou crescimento das raízes estatisticamente iguais em ambas as amostras A2 e A3, não sendo verificada diferenças de crescimento.

5.3.2 Crescimento relativo da raiz

Os crescimentos relativos das raízes das sementes de tomate, repolho e alface, para as duas amostras de lixiviado, A2 e A3, estão apresentados na Tabela 17. Os valores do CRR referem-se ao crescimento da raiz em relação a amostra em branco, sendo assim, os valores que apresentam CRR superiores a 100% tem como significado um tratamento cujo crescimento das raízes foi superior a amostra controle.

Tabela 17 - Valores do CRR das sementes estudadas para as amostras de lixiviado

Trat.	Conc. (%)	Tomate (%)		Repolho (%)		Alface (%)	
		A2	A3	A2	A3	A2	A3
T1	1,00	108,45	149,41	100,62	100,68	109,97	118,58
T2	1,50	145,30	123,90	84,10	96,12	129,37	103,78
T3	2,25	136,35	128,98	92,01	87,39	117,54	109,57
T4	3,38	141,24	134,07	64,91	77,85	100,33	117,66
T5	5,06	131,06	122,14	75,09	66,96	76,17	86,26
T6	7,60	84,81	61,95	46,35	47,87	56,58	35,30
T7	11,39	63,34	39,91	27,15	23,30	38,34	16,63

Legenda: Conc (%): concentração de lixiviado diluído, em porcentagem; A2: Amostra 2 de lixiviado; A3: Amostra 3 de lixiviado. Os valores do CRR estão em porcentagem.

Fonte: Autora (2021).

Os valores do CRR da semente de tomate para a amostra A2 variaram de 63,34 a 145,30% e para amostra A3, de 39,91 a 149,41%, sendo essa semente a que apresentou os maiores valores de CRR (Tabela 17). Em ambas as amostras, as concentrações de lixiviado iguais ou inferiores a 5,06% (T5) favoreceu o crescimento das raízes, CRR >100%. Segundo Young *et al.* (2012) efluentes que apresentam valores de CRR acima 120% são considerados efluentes estimulantes ao crescimento das sementes. Esse tipo de comportamento, ocorreu com a espécie de tomate em quatro tratamentos da amostra A2 e com cinco dos 7 tratamentos da amostra A3.

Nota-se que a redução no CRR nas sementes de tomate ocorreu apenas nos tratamentos T6 e T7. Observa-se ainda um pico de crescimento no tratamento T2 (CRR = 145,30%) da amostra A2. Tal fato pode estar associado a presença de nutrientes, que são os poluentes em baixas concentrações, os quais favorecem o desenvolvimento das raízes, a exemplo do fósforo e da matéria orgânica que estimulam o desenvolvimento das sementes (NAIKA *et al.*, 2006).

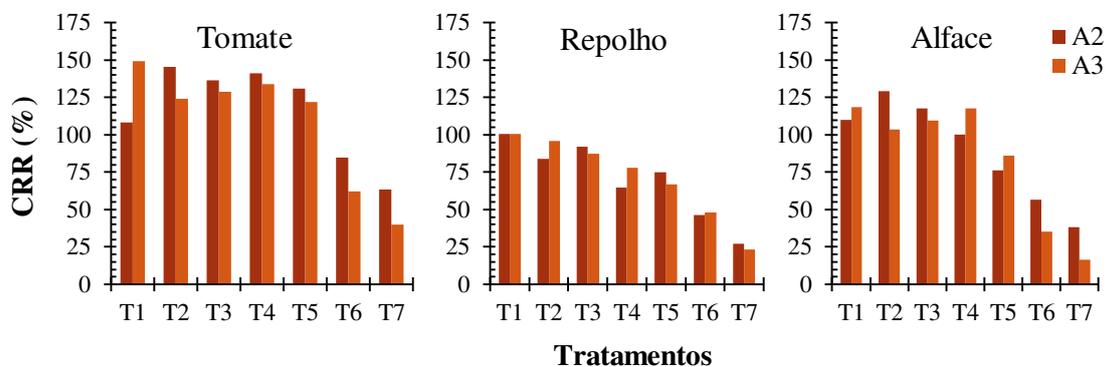
A semente de repolho apresentou CRR que variaram de 27,15 a 100,62% e de 23,30 a 100,68, para as amostras A2 e A3 de lixiviado, respectivamente. O tratamento T1 apresentou crescimento maior que a amostra controle (CRR > 100%) em ambas as amostras e as demais concentrações tiveram seus valores reduzidos à medida em que se aumentou a concentração do contaminante nos tratamentos.

Em relação aos valores do CRR da semente de alface, notou-se que houve estímulo ao crescimento apenas no tratamento T2 da amostra A2, e nos tratamentos T1, T2, T3 e T4 não houve efeitos significativos em relação ao crescimento, uma vez que os valores de CRR está na faixa entre 80 e 120% (Young *et al.*, 2012). Contudo, nos tratamentos T5, T6 e T7 observou-se

uma queda em seus valores, diretamente associado ao aumento da concentração do contaminante.

Cabe ainda enfatizar que o tratamento T7 (11,39%) além de ter causado efeito inibitório no crescimento das raízes em todas as espécies avaliadas, apresentou menores valores de CRR nas duas amostras. Sendo assim, elevadas concentrações de lixiviado alteram significativamente os valores do CRR. Para melhor visualizar a variação do CRR para as sementes estudadas, a Figura 36 ilustra esse comportamento.

Figura 36 - CRR das sementes do tomate, repolho e alface



Fonte: Autora (2021).

De modo geral, os tratamentos com baixas concentrações de contaminante causaram menor efeito inibitório no crescimento das raízes, e em alguns tratamentos houve favorecimento ao crescimento ($CRR > 100\%$), como foi o caso das sementes de tomate e alface. Apesar do lixiviado conter elevadas concentrações de contaminantes como a DQO e o NAT, em baixas concentrações, esses poluentes tornam-se nutrientes que estimulam o crescimento das raízes (LI *et al.*, 2017; ZULKEPLI *et al.*, 2020), e só a partir de determinada concentração que se observa o efeito de inibição ou retardo de crescimento.

Esse comportamento foi relatado por Arunbabu, Indu e Ramasamy (2017), ao verificar que o lixiviado em baixas concentrações não alteram significativamente o crescimento das raízes de sementes. Além disso, os autores observaram que existe uma concentração ideal (CI) de lixiviado que favorece o crescimento, em que, no seu estudo, a CI foi de 5%. Tal efeito de estímulo máximo também foi observado neste presente estudo para as sementes estudadas. Para as sementes de tomate e alface concentração ideal foi entre 1,00 e de 1,50%, já a semente repolho a CI foi de 1,00%, concentrações que apresentaram maiores valores de CRR.

Por meio da ANOVA foi verificado que não houve diferença estatística entre os valores do CRR para as três sementes da amostra A3, sendo essa diferença observada apenas na amostra A2. Por isso, deve-se sempre analisar mais de um indicador de efeito, pois neste estudo foi constatado diferenças de crescimento na A3, porém não houve em relação ao CRR.

5.3.3 Germinação relativa da semente

A germinação relativa da semente (GRS) refere-se a taxa de germinação quando comparada a amostra controle, assim, elevadas concentrações de contaminantes ou a baixa presença de nutrientes podem influenciá-la. Os valores da GRS das sementes de tomate, repolho e alface, para as duas amostras de lixiviado analisadas estão descritos na Tabela 18.

Tabela 18 - Germinação relativa da semente das sementes de tomate, repolho e alface para as amostras A2 e A3

Trat.	Conc. (%)	Tomate (%)		Repolho (%)		Alface (%)	
		A2	A3	A2	A3	A2	A3
T1	1,00	80,85	106,82	81,82	81,82	96,23	111,43
T2	1,50	97,87	104,55	93,18	97,73	77,36	74,29
T3	2,25	89,36	88,64	84,09	102,27	88,68	85,71
T4	3,38	97,87	88,64	84,09	77,27	73,58	85,71
T5	5,06	78,72	86,36	79,55	88,64	69,81	80,00
T6	7,60	74,47	90,91	59,09	59,09	83,02	51,43
T7	11,39	74,47	70,45	59,09	11,36	90,57	2,86

Legenda: Conc. (%): concentração do lixiviado diluído, em porcentagem; A2: Amostra 2 de lixiviado; A3: Amostra 3 de lixiviado. Os valores do GRS estão em porcentagem.

Fonte: Autora (2021).

Analisando os dados da Tabela 18, nota-se que os valores do GRS não variaram em grandes percentuais à medida em que se aumentou a concentração do contaminante. Na semente de tomate, a variação entre seus tratamentos foi de $84,80 \pm 10,24$ (média \pm desvio padrão) e de $90,91 \pm 12,17$, para as amostras A2 e A3, respectivamente. Sendo essa espécie a que apresentou os maiores valores de GRS. A GRS para a semente repolho apresentou maiores variações na amostra A3 ($74,04 \pm 31,08\%$) e menores da A2 ($77,27 \pm 13,12\%$). Em relação a semente de alface, os taxas de GRS variaram de $82,75 \pm 9,65\%$ e $70,20 \pm 34,60\%$, para as amostras A2 e A3, respectivamente, sendo a A3 a que apresentou maior variação.

Assim como neste estudo, Bożym Król e Mizerna (2021) também relataram a pequena variação da germinação na semente de alface entre os tratamentos analisados, para os autores,

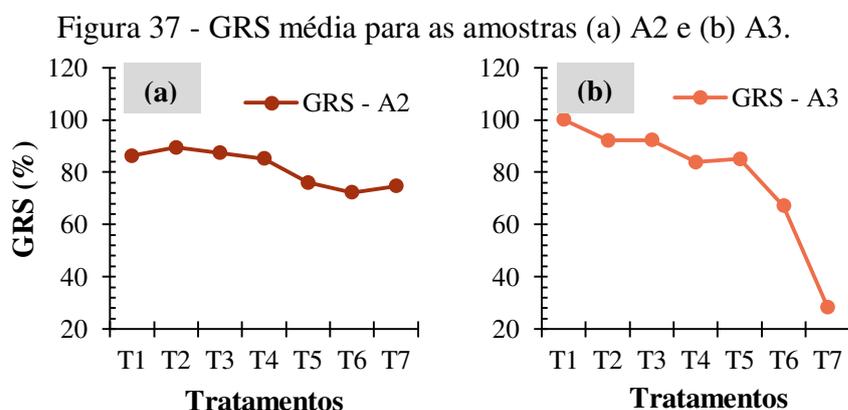
a germinação é um indicador menos sensível que o crescimento, portanto, na análise de fitotoxicidade de efluentes não se deve considerar apenas esse parâmetro.

Apesar das três sementes estudadas apresentarem médias e desvios padrões diferentes entre as amostras A2 e A3, não foi verificada diferença estatística entre suas taxas de GRS, ou seja, Tomate-A2 \cong Tomate-A3; Repolho-A2 \cong Repolho-A3; e Alface-A2 \cong Alface-A3. Esse comportamento mostra que as amostras testadas, apesar de diferirem em termos de concentrações dos poluentes, causaram o mesmo efeito na GRS das espécies.

Em relação a sensibilidade de cada semente quanto a germinação, por meio da ANOVA verificou-se que as espécies de tomate, repolho e alface não apresentaram diferença significativa entre seus valores de GRS ($p\text{-valor} > 0,05$), tanto na A2 como na A3. Logo, os valores de GRS de Tomate-A2, Repolho-A2 e Alface-A2 e Tomate-A3, Repolho-A3 e Alface-A3 tiveram estatisticamente a mesma taxa. Comportamento diferente ao que ocorreu em relação do crescimento das raízes.

No geral, o tratamento T7 apresentou menores valores do GRS quando comparado aos demais tratamentos, no entanto, na amostra A3 para a semente de tomate esse comportamento não foi observado. Os baixos valores na germinação no T7 podem estar associados a elevada concentração do contaminante, responsável por inibir o desenvolvimento das sementes.

Analisando a GRS por meio de uma média entre as três espécies estudadas, observa-se que para a amostra A2 (Figura 37a) houve pouca variação com valores $81,61 \pm 7,04\%$. Já a amostra A3 observa-se uma tendência de decaimento (Figura 37b), com valores de $78,38 \pm 24,37\%$. Por meio dessa análise, nota-se que a amostra A3 causou redução na taxa de germinação de acordo com o aumento das concentrações de lixiviado por tratamento. Então, considerando a germinação em termos da média, a amostra A3 causou efeitos mais significativos, uma vez que, o tratamento T7 apresentou $GRS < 30\%$.



Fonte: Autora (2021)

5.3.4 Índice de germinação

O índice de germinação da semente (IG) varia de acordo com a germinação e o crescimento das raízes estudadas. Os valores do IG para as espécies de tomate, repolho e alface para as duas amostras de lixiviado analisadas estão apresentados na Tabela 19.

Tabela 19 - Índice de germinação das sementes de tomate, repolho e alface para as amostras A2 e A3

Trat.	Conc. (%)	Tomate (%)		Repolho (%)		Alface (%)	
		A2	A3	A2	A3	A2	A3
T1	1,00	87,69	159,59	82,33	82,37	105,82	132,13
T2	1,50	142,20	129,53	78,36	93,93	100,08	77,09
T3	2,25	121,85	114,32	77,37	89,38	104,24	93,92
T4	3,38	138,23	118,83	54,59	60,15	73,83	100,86
T5	5,06	103,18	105,48	59,73	59,35	53,18	69,01
T6	7,60	63,16	56,32	27,39	28,28	46,97	18,16
T7	11,39	47,17	28,12	16,04	2,65	34,72	0,48

Classificação:


 Não fitotóxico
 Pouco fitotóxico
 Fitotóxico
 Muito fitotóxico

Fonte: Autora (2021).

O IG para a semente de tomate apresentou variação de $100,50 \pm 36,58\%$ (média \pm desvio padrão) e $101,74 \pm 44,86$ para as amostras A2 e A3 respectivamente, sendo essa espécie a que teve os maiores valores de IG. Segundo a classificação do IG adotada nesta pesquisa, os tratamentos T1, T2, T3, T4 e T5, em ambas as amostras, não causaram inibição na semente, sendo eles classificados como não fitotóxico. Já os tratamentos T6 e T7, para a amostra A2 foram classificadas como pouco fitotóxico e fitotóxico e para a amostra A3 foram considerados fitotóxicos e muito fitotóxicos, apresentando uma inibição forte a grave (TRAUTMANN E KRASNY, 1997). Sendo assim, para essa espécie a amostra A3 foi mais fitotóxica que a amostra A2.

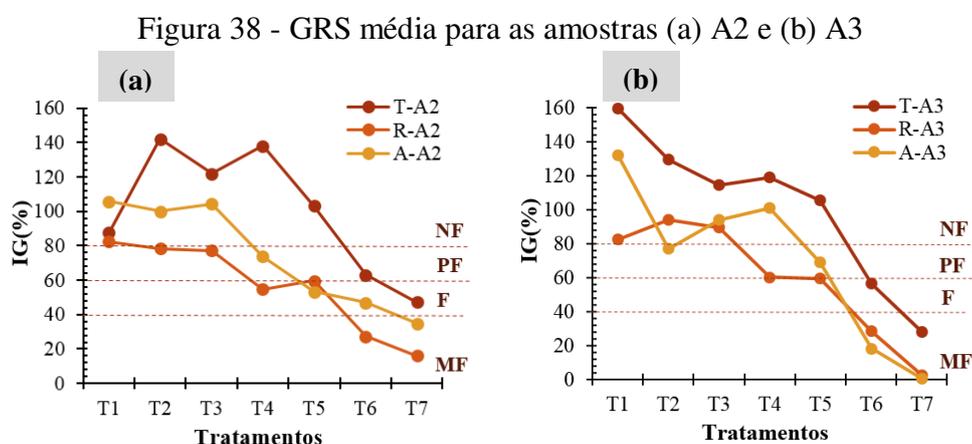
A espécie de repolho teve seu IG variando de $56,54 \pm 26,07$ e $59,45 \pm 33,68$ para as amostras A2 e A3, respectivamente. O tratamento T1 da amostra A2 foi o único que não causou inibição na semente, sendo ela não fitotóxica, e os demais tratamentos a toxicidade elevou à medida em que houve o aumento das concentrações do contaminante. Já na amostra A3, as três primeiras concentrações (T1, T2 e T3) foram consideradas sem efeito inibitório (não fitotóxica), a T4 foi pouco fitotóxica e a T5 foi fitotóxica. Os tratamentos T6 e T7 tiveram inibição grave nas duas amostras, sendo eles considerados tratamentos muito fitotóxicos. Essa espécie apresentou mais sensibilidade as mudanças de composição do lixiviado, pois mesmo que

pequenas, houve diferentes comportamento no IG. Isso pode ser observado o IG do tratamento T7, cuja valor da amostra A3 foi cerca de seis vezes mais tóxico que a A2.

Para a semente de alface, amostra A2, o lixiviado causou toxicidade nas três menores concentrações (T1, T2 e T3) e nas concentrações seguintes o IG foi reduzindo, chegando a uma inibição forte no tratamento T7, IG igual a 34,72%, classificando-o como muito fitotóxico. Enquanto que, a amostra A3, para essa mesma espécie, teve um comportamento um pouco diferente quando comparado a A2, pois os tratamentos T2 e T5 foram pouco fitotóxicos, e as concentrações correspondentes aos T1, T3 e T4, não houve efeito de inibição, sendo esses tratamentos não fitotóxico. Os tratamentos T6 e T7 foram classificados como muito fitotóxicos, uma vez que causaram inibição grave nas sementes, $IG < 20\%$. Apesar da amostra A2 causar uma redução gradativa do IG, na amostra A3 houve maiores danos a germinação da semente nos dois últimos tratamentos. Deste modo, pode-se inferir que a amostra A3 foi mais fitotóxica para a semente de alface.

Avaliando a sensibilidade das três sementes observa-se que na amostra A2 (Figura 38a) a de repolho foi mais sensível ao lixiviado, pois os tratamentos com maiores concentrações de lixiviado foram muito fitotóxicos. As sementes de tomate a alface foram mais resistentes as concentrações menores de lixiviado, apresentando $IG \geq 80\%$. Ou seja, o lixiviado em pequenas concentrações não causam efeito significativo no desenvolvimento dessas espécies de semente. Desta forma, colocando as sementes estudadas em ordem de sensibilidade tem-se: repolho > alface > tomate.

Em se tratando da amostra A3 (Figura 38, b) observa-se um comportamento similar ao da amostra A2, mantendo-se a ordem de sensibilidade das espécies estudadas (repolho > alface > tomate), porém essa amostra causou maior efeito negativos no IG para as três espécies.



Legenda: NF: Não fitotóxico; PF: pouco fitotóxico; F: fitotóxico; MF: muito fitotóxico.
Fonte: Autora (2021).

A sensibilidade das sementes também foi relatada por Enaime *et al.* (2020), segundo os autores as sementes de milho e tomate quando exposta às águas residuais de moinho de oliveira, apresentaram diferentes comportamento no IG. No entanto, para ambas as espécies as elevadas concentrações do contaminante causaram redução no IG, comportamento este, também encontrado neste presente estudo.

5.3.5 Concentração efetiva de inibição do crescimento

As estimativas da concentração efetiva capaz de causar inibição do crescimento das raízes das sementes estudadas em 50% (CE₅₀), estão expostas na Tabela 20.

Tabela 20 - Valores da CE₅₀ das sementes de tomate, repolho e alface para as amostras A2 e A3

	Tomate	Repolho	Alface
CE₅₀ (%) - A2	14,10	7,60	9,20
CE₅₀ (%) - A3	10,29	7,50	7,84
Média	12,20	7,55	8,52

Fonte: Autora (2021).

Por meio da Tabela 20, observa-se que a semente de repolho, apresentou os menores valores de CE₅₀, em ambas as amostras, o que significa que o lixiviado foi mais fitotóxico para esta espécie. Esse comportamento comprova o resultado da subseção 5.3.4, em que pelo IG foi identificado que a semente de repolho possuiu maior sensibilidade ao contaminante. Além disso, observa-se que CE₅₀, para essa semente não houve muita variação, mostrando-se uma semente com maior estabilidade para avaliação de toxicidade de lixiviado. Já a semente de tomate foi mais resistente as concentrações de lixiviado, apresentando CE₅₀ maiores que as demais espécies.

Ainda na Tabela 20, nota-se que a amostra A3 foi mais fitotóxica para três espécies estudadas. Apesar de não ser verificada diferença estatística em termos de crescimento das raízes e em relação ao GRS para as amostras A2 e A3, por meio da estimativa da CE₅₀, foi identificado variação na toxicidade para entre as sementes e entre as amostras.

Cabe acrescentar que, embora a amostra A3 apresentou em sua composição físico-química menores concentrações de pH, AT, cloretos e metais foi verificado uma redução nos valores da CE₅₀ para as três espécies estudadas. Isso pode ter ocorrido em função das elevadas concentrações da DQO e os SVT obtidas nessa amostra. Conforme, Gupta e Paulraj (2016) a formação de complexos orgânicos causada pelo aumento no conteúdo orgânico, a exemplo da

DQO e DBO, eleva a toxicidade do lixiviado. Em consequência disso, são observadas alterações significativas em organismos quando e exposto a esse tipo de efluente. Desta forma, a redução da CE_{50} na A3 pode ter sido influenciada pelo aumento da DQO e SVT, elevando assim, a fitotoxicidade. Além do mais outros componentes não identificados na análise físico-química realizada, a exemplo dos poluentes emergentes possuem um elevado potencial de toxicidade (MASONER *et al.* 2016).

Portanto, a análise de fitotoxicidade além de ser feita mediante os parâmetros de CRR, GRS e IG, deve-se considerar a estimativa da CE. Essa metodologia parte do pressuposto que o organismo possui um comportamento linear a fim de estimar as diferentes concentrações de inibição do crescimento (CE_{90} , CE_{10}), situações em que devido à pouca variação no crescimento a estatística não considera como efeito significativo.

Para melhor visualizar o efeito da redução de crescimento das raízes a medida em que se aumenta a concentração de lixiviado, as Figura 39 e Figura 40 ilustram as curvas dose-respostas para cada uma das amostras.

Figura 39 - Curva dose-resposta do crescimento das sementes de tomate (a), repolho (b) e alface (c) da amostra A2

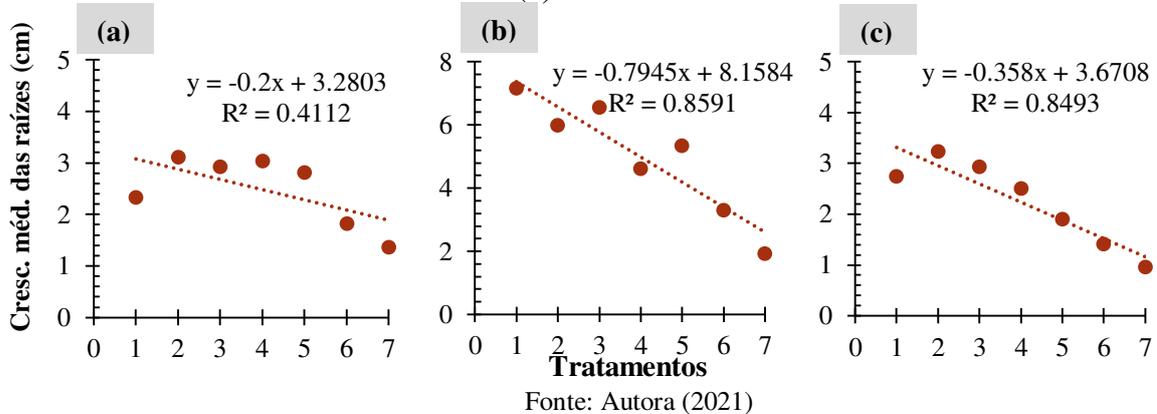
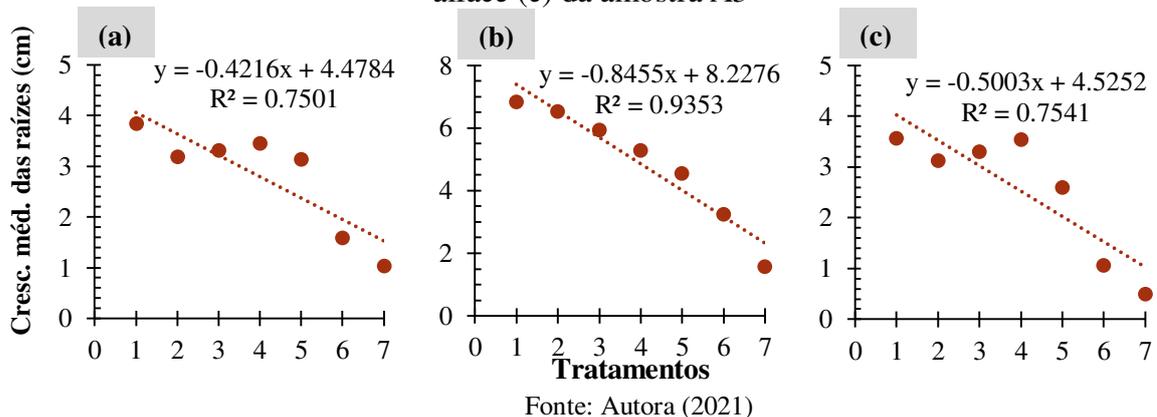


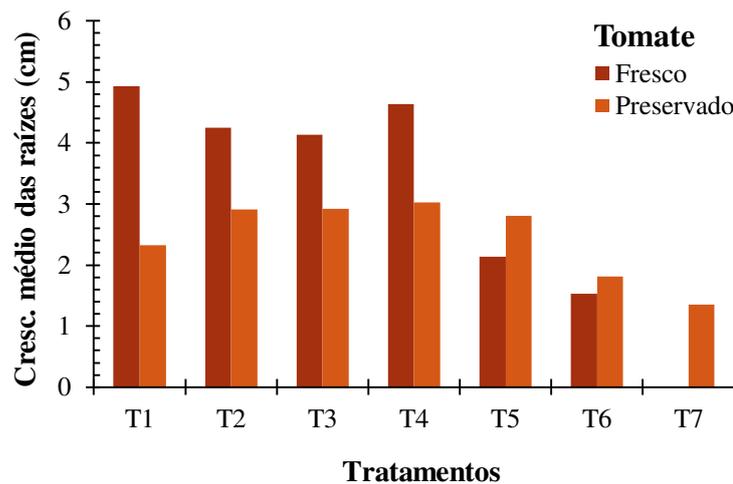
Figura 40 - Curva dose-resposta do crescimento das sementes de tomate (a), repolho (b) e alface (c) da amostra A3



5.3.6 Comparação entre o lixiviado fresco e preservado

Analisando primeiramente a amostra A2, observou-se que para a semente de tomate, os tratamentos T1 (1%), T2 (1,5%), T3 (2,25%) e T4 (3,375%) do lixiviado fresco proporcionou maior crescimento quando comparado com o lixiviado preservado (Figura 41). No entanto, as concentrações superiores ao T5 (5,60%) houve queda no crescimento ao ponto do T7 (11,38%) não permitir o desenvolvimento da raiz, inibindo o crescimento em 100% (Figura 41). Em relação ao crescimento da raiz por tratamento, foi verificada diferença estatística entre os dois efluentes (fresco e preservado) exceto no tratamento T6 (7,60%), *p*-valor superior a 0,05. Assim, as alterações nas condições de acondicionamento do lixiviado causa comportamentos diferentes quanto a inibição do crescimento das raízes.

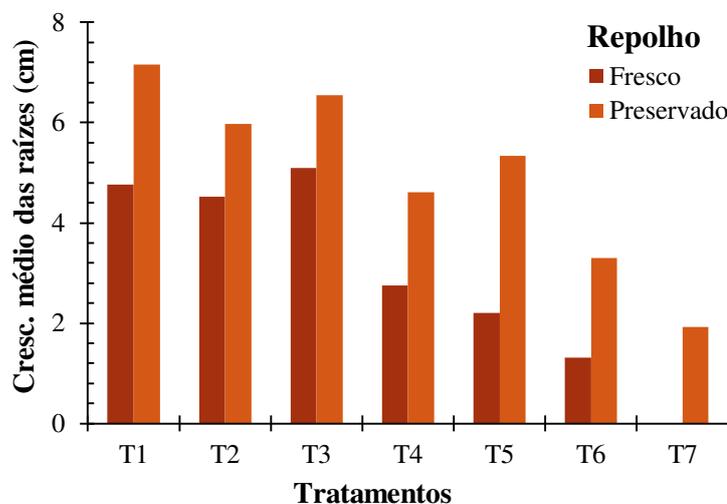
Figura 41 - Comparativo do crescimento médio das raízes entre o lixiviado fresco e o preservado para a semente de tomate



Fonte: Autora (2021).

Oposto ao comportamento da semente de tomate, na semente de repolho (Figura 42) o lixiviado fresco proporcionou um menor crescimento nas raízes em todas as concentrações quando comparado com o lixiviado preservado. Além disso, por meio da ANOVA foi possível verificar a existência de diferença significativa entre os efluentes em todos os tratamentos (*p*-valor < 0,05).

Figura 42 - Comparativo do crescimento médio das raízes entre o lixiviado fresco e o preservado para a semente de repolho



Fonte: Autora (2021).

Cabe salientar, que a concentração de 11,39% não houve crescimento das raízes, em ambas as sementes (tomate e repolho) quando expostas ao lixiviado fresco. No entanto, o lixiviado preservado apresentou crescimento médio de 1,36 e 1,93 cm para as sementes de tomate e repolho, respectivamente. Logo, o lixiviado fresco inibiu mais fortemente o crescimento das raízes do que o lixiviado preservado.

Comparando em termos da CE_{50} (Tabela 21) nota-se que para ambas as sementes de tomate e repolho, a amostra fresca inibiu com maior intensidade o seu desenvolvimento, apresentando valores da CE_{50} menores que a amostra preservada.

Tabela 21 - Valores da CE_{50} das amostras preservadas e frescas

	Tomate		Repolho	
	Preservada	Fresca	Preservada	Fresca
CE_{50} (%) - A2	14,13	7,21	7,64	5,40
CE_{50} (%) - A3	10,29	6,06	7,50	5,59

Fonte: Autora (2021).

Para a semente de tomate, a amostra fresca A2 foi mais tóxica que a mostra preservada em quase 100%. Já a amostra preservada A3, superestimou a CE_{50} em aproximadamente 70%. O mesmo comportamento também foi observado para a semente de repolho, porém com menor intensidade. A amostra preservada superestimou a CE_{50} em aproximadamente 41%, na amostra A2, e em 34% na amostra A3. Portanto, mediante os dados apresentados, a amostra de lixiviado fresco foi mais fitotóxica as sementes de tomate e repolho que o lixiviado preservado.

A existência de estudos que abordam esse comparativo é escassa, pois os ensaios ecotoxicológicos são realizados seguindo normas, logo, não há contestação sobre tais fatos. Porém, sabe-se que, em amostras frescas todos os poluentes estão na forma ativa e quando são colocados para preservar, em congelamento, pode haver alterações na composição desses poluentes. Dessa forma, sugere-se para estudos futuros melhores análises, como a realização de análises físico-químicas a fim de verificar quais parâmetros tiveram seus valores alterados e entender melhor esse comportamento.

5.4 Sensibilidade dos organismos-teste

Analisando a sensibilidade dos quatro organismos-teste utilizados nesta pesquisa, por meio da Tabela 22, observa-se que eles apresentaram sensibilidades diferentes. Nesta seção, para fins de comparação entre os organismos (minhocas e sementes), o efeito de inibição do crescimento das raízes das sementes foi considerado como efeito letal de crescimento.

Tabela 22 - Valores da CE e CL dos organismos

CE _{50-5dias} (%)		CL _{50-14dias} (%)	
Tomate	Repolho	Alface	Minhocas
14,13	7,64	9,23	56

Fonte: Autora (2021).

Na Tabela 22, nota-se que as sementes foram mais sensíveis ao lixiviado, quando comparado as minhocas. A concentração estimada que causou efeito letal de 50% das sementes, CE₅₀, variou de 7 a 15% (v/v), cuja toxicidade ainda dependeu da espécie utilizada, pois conforme apresentado na subseção 5.3.4 houve diferença de sensibilidade entre elas. No entanto, as minhocas, tiveram maiores resistência ao lixiviado, visto que a estimativa do efeito letal de 50% dos organismos foi de 56% (v/v).

A avaliação de toxicidade de lixiviado estudada por Budi *et al.* (2016) identificou que o peixe (*Rasbora sumatrana*) apresentou maior sensibilidade quando comparado ao camarão (*Macrobrachium lanchesteri*) e as sementes de tomate (*Lycopersicon esculentum*). Para os autores, a diferença de sensibilidade entre os organismos deve-se a diferença entre as espécies.

Diante dos resultados apresentados, a avaliação da toxicidade em efluentes de grande complexidade, como o lixiviado, devem, sempre que possível, utilizar organismos de diferentes níveis taxonômicos, pois determinada concentração do contaminante podem ser mais tóxica para um organismo do que para outro, como verificado nesse presente estudo.

6 CONCLUSÕES

- O lixiviado de aterro sanitário disposto em solo foi tóxico para as minhocas da espécie *Eisenia andrei*, cujo efeito letal teve maior intensidade nas primeiras horas de exposição ao contaminante e os efeitos adversos causados aos organismos como a perda de biomassa, deformações corporais e a morte foram mais significativos à medida em que se aumentou as concentrações do contaminante no solo.
- O efluente causou comportamento de fuga aos organismos mesmo em baixas concentrações (< 15%), o que mostra sua sensibilidade ao substrato contaminado com lixiviado. Notou-se ainda que o ensaio comportamental de fuga é complementar ao ensaio de letalidade, dado que, a concentração que causou a perda de habitat as minhocas *Eisenia andrei* esteve próxima a faixa de concentração que houve morte de 50% da morte desses organismos.
- Por meio dos parâmetros fitotóxicológicos CRR, IG e CE₅₀ foi possível determinar a toxicidade do lixiviado de aterro sanitário, no entanto, o IG e a CE₅₀ apresentaram melhor desempenho, devido identificarem os diferentes graus de toxicidade para as sementes e para as amostras estudadas. Além disso, a GRS, isoladamente, mostrou-se insuficiente na avaliação fitotóxicológica, pois, no geral, não foi observado a redução da germinação com o aumento das concentrações do contaminante. Ademais, a espécie de repolho apresentou maior sensibilidade ao contaminante, seguida das espécies de alface e tomate.
- Em relação a fitotoxicidade das amostras fresca e preservada, o estudo concluiu que o lixiviado fresco possuiu maior toxicidade que amostra preservada.
- Neste estudo, as três espécies de plantas foram mais sensíveis ao lixiviado de aterro sanitário que as minhocas *Eisenia andrei*, notou-se ainda que os efeitos do contaminante nas sementes é gradativa, à medida em que se aumenta a concentração do contaminante ocorre a redução do crescimento das raízes, já as minhocas são mais resistentes as concentrações mais baixas, cujo efeito letal é mais marcante nas elevadas concentrações.
- Portanto, conclui-se que o lixiviado de aterro sanitário possui um elevado potencial tóxico aos organismos-teste analisados, logo, esse efluente em contato com o solo pode acarretar danos irreparáveis a biota terrestre. Além disso, os resultados dos bioensaios foram satisfatórios, então, os organismos investigados podem ser adotados como bioindicadores para avaliação toxicológica do efluente em questão.

7 REFERÊNCIAS

- ABD EL-SALAM, M. M.; ABU-ZUID, G. I. Impact of landfill leachate on the groundwater quality: A case study in Egypt. **Journal of Advanced Research**, v. 6, n. 4, p. 579–586, 1 jul. 2015.
- ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **Norma NBR 6457/86**: Amostras de solo – Preparação para Ensaios de Compactação e Ensaios de Caracterização. Rio de Janeiro, 1986.
- _____. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **Norma NBR 13896**: Aterros de resíduos não perigosos - Critérios para projeto, implantação e operação. Rio de Janeiro; 1997.
- _____. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **Norma NBR ISO 17512-1/2011**: qualidade do solo: ensaio de fuga para avaliar a qualidade de solos e efeitos de substâncias químicas no comportamento: parte 1: ensaio com minhocas (*Eisenia fetida* e *Eisenia andrei*). Rio de Janeiro, 2011.
- _____. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **Norma NBR/ISO 16387**: qualidade do solo: efeitos de poluentes em Enchytraeidae (*Enchytraeus* sp.): determinação de efeitos sobre reprodução e sobrevivência. Rio de Janeiro, 2012.
- _____. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **Norma NBR 15537**: ecotoxicologia terrestre: ecotoxicidade aguda: método de ensaio para minhocas. Rio de Janeiro, 2014.
- _____. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **Norma NBR 15469:2015** - Ecotoxicologia - Coleta, preservação e preparo de amostras. 2. ed. Rio de Janeiro: ABNT, 2015.
- ABUNAMA, T.; TENGKU NILAM, T. I.; OTHMAN, F. Comparison of landfill leachate generation and pollution potentials in humid and semi-arid climates. **International Journal of Environment and Waste Management**, v. 27, n. 1, p. 79, 2021.
- ADAMCOVÁ, D.; VAVERKOVÁ, M. D.; BARTOŇ, S.; HAVLÍČEK, Z.; BŘOUŠKOVÁ, E. Soil contaminations in landfill: a case study of the landfill in Czech Republic. **Soil contaminations in landfill: a case study of the landfill in Czech Republic**, v. 7, n. 4, p. 2927–2952, 2015.
- ADEYEMI-ALE, O. A.; ANIFOWOSHE, A. T. .; ABDULKAREEM, S. I. Ecotoxicological assessment of leachate from amilegbe dumpsite, ilorin, nigeria using *Clarias gariepinus* (Burchell 1822) and *Allium cepa*. **Agrosearch**, v. 26, n. 9, p. 59–71, 2018.
- ALAM, R.; AHMED, Z.; HOWLADAR, M. F. Groundwater for Sustainable Development Evaluation of heavy metal contamination in water , soil and plant around the open landfill site Mogla Bazar in Sylhet , Bangladesh. **Groundwater for Sustainable Development**, v. 10, n. November 2019, p. 100311, 2020.
- ALGHAMDI, A. G.; ALY, A. A.; IBRAHIM, H. M. Assessing the environmental impacts of municipal solid waste landfill leachate on groundwater and soil contamination in western Saudi Arabia. **Arabian Journal of Geosciences**, v. 14, n. 5, 2021.
- ALIMBA, C. G.; GANDHI, D.; SIVANESAN, S.; BHANARKAR, M. D.; NAOGHARE, P. K.; BAKARE, A. A.; KRISHNAMURTHI, K. Chemical characterization of simulated landfill soil leachates from Nigeria and India and their cytotoxicity and DNA damage inductions on three human cell lines. **Chemosphere**, v. 164, p. 469–479, 1 dez. 2016.

ANDRÉA, M. M. O uso de minhocas como bioindicadores de contaminação de solos. **Acta Zoologica Mexicana**, v. 26, p. 97-107, 2010.

APHA. Standard Methods for the Examination of Waste and Wastewater. 23rd ed., American Public Health Association, Washington, DC., 2017.

ARAGÃO, M. A.; ARAÚJO, R. P. A.; Métodos de ensaios de toxicidade com organismos aquáticos. *In*: ZAGATTO, P. A. & BERTOLETTI, E. (Org.). **Ecotoxicologia aquática: Princípios e Aplicações**. São Carlos: RiMa. 2014. p. 117-152.

ARUNBABU, V.; INDU, K. S.; RAMASAMY, E. V. Leachate pollution index as an effective tool in determining the phytotoxicity of municipal solid waste leachate. **Waste Management**, v. 68, p. 329–336, 2017.

AYDIN, M. E.; AYDIN, S.; BAHADIR, M.; KOLB, M. Toxicity Assessment of Landfill. **Fresenius Environmental Bulletin**, n. 11, 2015.

BARETTA, D.; SEGAT, J. C.; OLIVEIRA FILHO, L. C. I.; MACCARI, A. P.; SOUSA, J. P.; ROMBKE, J. Ecotoxicologia terrestre com ênfase na fauna edáfica. *In*: NIVA, C. C.; BROWN, G. G. (Org.). **Ecotoxicologia Terrestre: métodos e aplicações dos ensaios com oligoquetas**. Brasília: Embrapa, 2019. p. 23-43.

BARSZCZ, L. B; BELLATO, F. C.; BENASSI, R. F.; MATHEUS, D. R. Avaliação ecotoxicológica de efluentes tratados por alagados construídos. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 24, p. 1147-11556, 2019.

BERTOLETTI E. Determinação da ecotoxicidade crônica para Danio rerio. **Journal Brazilian Society Ecotoxicology**, v. 4, n. 1–3, 2009, p. 1-7.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Resolução CONAMA nº 420 de 28 de dezembro de 2009**. Dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas. Disponível em: <<http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=620>>. Acesso em: 21 de mar. 2021.

_____. Ministério do Meio Ambiente. **Resolução CONAMA nº 430 de 13 de maio de 2011**. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução no 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA. Disponível em: <<http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=646>>. Acesso em: 20 de mar. 2021.

BOŻYM, M.; KRÓL, A.; MIZERNA, K. Leachate and contact test with *Lepidium sativum* L. to assess the phytotoxicity of waste. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 18, n. 7, p. 1975–1990, 2021.

BUDI, S.; SULIASIH, B. A.; OTHMAN, M. S.; HENG, L.Y.; SURIF, S. Toxicity identification evaluation of landfill leachate using fish, prawn and seed plant. **Waste Management**, v. 55, p. 231–237, 2016.

CANTO, T.; PICH, C. T.; GEREMIAS, R. Bioensaio de toxicidade em percolados no aterro sanitário do município de Araranguá (Santa Catarina, Brasil). **Revista Biociências**, v. 19, n.2, p. 53-60, 2013.

CALABRÒ, P. S.; GENTILI, E.; MEONI, C.; ORSI, S.;KOMILIS, D. Effect of the recirculation of a reverse osmosis concentrate on leachate generation: A case study in an Italian landfill. *Waste Management*. v. 76, p. 643-651, 2018.

CASTILHOS Jr. A. B. *et al.* Principais processos de degradação de resíduos sólidos urbanos. In: CASTILHOS Jr. A. B. (Org.). Resíduos sólidos urbanos: aterro sustentável para municípios de pequenos portes. Rio de Janeiro: **ABES**, 2003. Cap 2, p. 19-50.

CONNELL, D.W., LAM, P.K.S., RICHARDSON, B.R., WU, R.S.S. Introduction to Ecotoxicology. Blackwell Science, Abingdon. 170 p. 1999.

COSTA, F. M.; DAFLON, S. D. A.; BILA, D. M.; FONSECA, F. V.; CAMPOS, J. C.. Evaluation of the biodegradability and toxicity of landfill leachates after pretreatment using advanced oxidative processes. **Waste Management**, v. 76, p. 606–613, 2018.

COSTA, A. M.; ALFAIA, R. G. S. M.; CAMPOS, J. C. Landfill leachate treatment in Brazil – An overview. **Journal of Environmental Management**, v. 232, n. November 2018, p. 110–116, 2019.

COLOMBO, A.; MÓDENES, A. N.; TRIGUEROS, D. E. G.; MEDEIROS, B. L.; MARIN, P.; BLANCO, S. P. D. M.; HINTERHOLZ, C. L. Toxicity evaluation of the landfill leachate after treatment with photo-Fenton, biological and photo-Fenton followed by biological processes. **Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering**, v. 54, n. 4, p. 269–276, 2019.

DASARATHY. S.; MOOKERJEE, R. P.; RACKAYOVA, V.; THRANE, V. R.; VAIRAPPAN, B.; OTT, P.; ROSE, C. F. Ammonia toxicity: from head to toe? **Metabolic Brain Disease**, v. 32, n. 2, p. 529–538, 2017.

DI CARLO, E.; BOULLEMANT, A.; POYNTON, H.; COURTNEY, R. Exposure of earthworm (*Eisenia fetida*) to bauxite residue: Implications for future rehabilitation programmes. **Science of the Total Environment**, v. 716, p. 137126, 2020.

DOMINGUES, D. F; BERTOLETTI, E. Seleção, manutenção e cultivo de organismos aquáticos. In: ZAGATTO, P. A. & BERTOLETTI, E. (Org.). **Ecotoxicologia aquática: Princípios e Aplicações**. São Carlos: RiMa. 2014. p. 153-184.

ECOTERRA AMBIENTAL. **RIMA - Relatório de Impacto Ambiental**: Projeto de Implantação de um Aterro Sanitário para Resíduos Sólidos no Município de Campina Grande – Pb. Campina Grande, 2010. 75p.

ENAIME, G.; BAÇAOU, A.; YAACOUBI, A.; BELAQZIZ, M.; WICHERN, M.; LÜBKEN, M. Phytotoxicity assessment of olive mill wastewater treated by different technologies: effect on seed germination of maize and tomato. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 8, p. 8034–8045, 2020.

ENUNEKU, A.; BIOSE, E.; EZEMONYE, L. Levels, distribution, characterization and ecological risk assessment of heavy metals in road side soils and earthworms from urban high

traffic areas in Benin metropolis, Southern Nigeria. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 5, n. 3, p. 2773–2781, 2017.

FAUZIAH, S. H.; IZZATI, M. N.; AGAMUTHU, P. Toxicity on *Anabas Testudineus*: A Case Study of Sanitary Landfill Leachate. **Procedia Environmental Sciences**, v. 18, p. 14–19, 2013.

FILSER, J.; KOEHLER, H.; RUF, A.; RÖMBKE, J.; PRINZING, A.; SCHAEFER, M. Ecological theory meets soil ecotoxicology: challenge and chance. **Basic and Applied Ecology**, v. 9, p. 346-355, 2008.

FRANCO, H. A. MARJORY, G.; MARTINS, O.; MUSSEL, L.; MORENO, S. C.; THODE, S.; MARQUES, C. 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, p. 36–43, 2017.

FOO, K.Y., HAMEED, B.H. An overview of landfill leachate treatment via activated carbon adsorption process. *Journal of Hazardous Materials*. 171, p. 54–60. 2009

GARCIA, M. V. B. **Effects of pesticides on soil fauna**: development of ecotoxicological test methods for tropical regions. 2004. 283 f. Theis (Ph.D.) - University of Bonn, Bonn.

GHIASINEJAD, H.; GHASEMI, M.; SHARIATMADARI, N.; PAZOKI, M. Prediction of landfill leachate quantity in arid and semiarid climate: a case study of Aradkouh, Tehran. *International Journal of Environmental Science and Technology*, v. 18, n. 3, p. 589-600, 2021.

GHOSH, P.; THAKUR, I. S.; KAUSHIK, A. Ecotoxicology and Environmental Safety Bioassays for toxicological risk assessment of land fill leachate: A review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 141, n. March, p. 259–270, 2017.

GOMES, N. A. **Análise da toxicidade do lixiviado gerado em uma célula do Aterro Sanitário em Campina Grande – PB**. 2017. 86 fls. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil e Ambiental) – Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2017.

GOMES, N. A.; ALMEIDA, M. V. A.; MELO, M. C.; MONTEIRO, V. E. D.; OLIVEIRA, R. Influência de parâmetros físico-químicos na composição de constituintes tóxicos em lixiviado de aterro sanitário. *Revista Matéria*. v. 23, n. 3, 2018.

GOWRI, S.; THANGARAJ, R. Studies on the toxic effects of agrochemical pesticide (Monocrotophos) on physiological and reproductive behavior of indigenous and exotic earthworm species. **International Journal of Environmental Health Research**, v. 30, n. 2, p. 212–225, 2020.

GUPTA, A.; PAULRAJ, R. Leachate composition and toxicity assessment: an integrated approach correlating physicochemical parameters and toxicity of leachates from MSW landfill in Delhi. **Environmental Technology (United Kingdom)**, v. 38, n. 13–14, p. 1599–1605, 18 jul. 2017.

HATTAB, S.; BOUGHATTAS, I.; MKHININI, M.; BANNI, M. Impact of Intensive Farming on Soil Heavy Metal Accumulation and Biomarkers Responses of Earthworms *Eisenia andrei*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 105, n. 4, p. 559–564, 2020.

HE, C.; ARIZONO, K.; JI, H.; YAKUSHIJI, Y.; ZHANG, D.; HUANG, K.; ISHIBASHI, Y. Comparison of mercury and methylmercury bioaccumulation in earthworms (*Bimastus parvus*)

native to landfill-leachate-contaminated forest soil. **Journal of Toxicological Sciences**, v. 43, n. 7, p. 459–471, 2018.

HOAI, S.T.; LAN, H. N.; VIET, N. T. T.; HOANG, G. N.; KAWAMOTO, K. Characterizing seasonal variation in landfill leachate using leachate pollution index (LPI) at nam son solid waste landfill in Hanoi, Vietnam. **Environments - MDPI**, v. 8, n. 3, p. 1–11, 2021.

HUSSEIN, M.; OTHMAN, N.; YONEDA, K.; ZAKI, Z.; AMIR, A. Leachate characterizations and pollution indices of active and closed unlined landfills in Malaysia. **Environmental Nanotechnology, Monitoring and Management**, v. 12, 2019.

INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA DO BRASIL – INMET. **Banco de Dados Meteorológicos para Ensino e Pesquisa (BDMET)**. Brasília - DF, 2020. Disponível em: <http://www.inmet.gov.br/projetos/rede/pesquisa/mapas_c_diario.php>. Acesso em: 24 de março de 2021.

ISO. International Organisation for Standardisation. **ISO 11268-1**: Soil quality - Effects of pollutants on earthworms — Part 1: Determination of acute toxicity to *Eisenia fetida*/*Eisenia Andrei*. 2012a.

ISO. International Organisation for Standardisation. **ISO 11268-2**: soil quality- effects of pollutants on earthworms. Part 2: determination of effects on reproduction of *Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*. 2012b.

JORDAAN, M. S.; REINECKE, S. A.; REINECKE, A. J. Acute and sublethal effects of sequential exposure to the pesticide azinphos-methyl on juvenile earthworms (*Eisenia andrei*). **Ecotoxicology**, v. 21, n. 3, p. 649–661, 2012.

KIM, J. H.; KANG, Y. J.; KIM, K.I.; KIM, S. K.; KIM, J. Toxic effects of nitrogenous compounds (ammonia, nitrite, and nitrate) on acute toxicity and antioxidant responses of juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 67, n. January, p. 73–78, 2019.

KLAUCK, C.; RODRIGUES, M.; SILVA, L. Evaluation of phytotoxicity of municipal landfill leachate before and after biological treatment. **Brazilian Journal of Biology**, v. 75, n. 2 suppl, p. 57–62, 2015.

KLAUCK, C. R.; GIACOBBO, A.; OLIVEIRA, E. D. L.; SILVA, L. B.; RODRIGUES, M. A. S. Evaluation of acute toxicity, cytotoxicity and genotoxicity of landfill leachate treated by biological lagoon and advanced oxidation processes. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 5, n. 6, p. 6188–6193, 2017.

KLISZCZ, A.; PUŁA, J. The change of ph value and octolasion cyaneum savigny earthworms' activity under stubble crops after spring triticale continuous cultivation. **Soil Systems**, v. 4, n. 3, p. 1–11, 2020.

KJELDTSEN, P.; BARLAZ, M. A.; ROOKER, A. P.; BAUN, A.; LEDIN, A.; CHRISTENSEN, T. H. Present and long-term composition of MSW landfill leachate: A review. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 32, n. 4, p. 297–336, 2002.

LACKMANN, C.; VELKI, M.; SEILER, T. B.; HOLLERT, H. Herbicides diuron and fluazifop-p-butyl affect avoidance response and multixenobiotic resistance activity in earthworm *Eisenia andrei*. **Chemosphere**, v. 210, p. 110–119, 2018.

- LI, G.; CHEN, J.; YAN, W.; SANG, N. A comparison of the toxicity of landfill leachate exposure at the seed soaking and germination stages on *Zea mays* L. (maize). **Journal of Environmental Sciences (China)**, v. 55, n. 2008, p. 206–213, 2017.
- LISBÔA, R. M.; STORCK, T. R.; SILVEIRA, A. O.; WOLFF, D.; TIECHER, T. L.; BRUNETTO, G.; CLASEN, B. Ecotoxicological responses of *Eisenia andrei* exposed in field-contaminated soils by sanitary sewage. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 214, 2021.
- LIU, T.; WANG, X. XU, J.; YOU, X.; CHEN, D.; WANG, F.; LI, Y. Biochemical and genetic toxicity of dinotefuran on earthworms (*Eisenia fetida*). **Chemosphere**, v. 176, p. 156–164, 2017.
- LUO, H.; ZENG, Y.; CHENG, Y.; HE, D.; PAN, X. Recent advances in municipal landfill leachate: A review focusing on its characteristics, treatment, and toxicity assessment. **Science of the Total Environment**, v. 703, p. 135468, 2020.
- MASONER, J. R.; KOLPIN, D. W.; FURLONG, E. T.; COZZARELLI, I. M.; GRAY, J. L. Landfill leachate as a mirror of today's disposable society: Pharmaceuticals and other contaminants of emerging concern in final leachate from landfills in the conterminous United States. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 35, n. 4, p. 906–918, 1 abr. 2016.
- MAHAPATRA, D.M., CHANAKYA, H.N., RAMACHANDRA, T.V.,. Role of macrophytes in sewage fed urban lake. *Inst. Integr. Omics. Appl. Biotechnol.* v. 2, p. 1- 9. 2011.
- MAKARENKO, N.; BUDAK, O. Waste management in Ukraine: Municipal solid waste landfills and their impact on rural areas. **Annals of Agrarian Science**, v. 15, n. 1, p. 80–87, 2017.
- MAVAKALA, B. K; LE FAUCHEUR, S. MULAJI, C. K; LAFFITE, A.; DEVARAJAN, N.; BIEY, E. M.; GIULIANI, G.; OTAMONGA, J.; KABATUSUILA, P.; MPIANA, P. T.; POTÉ, J. Leachates draining from controlled municipal solid waste landfill: Detailed geochemical characterization and toxicity tests. **Waste Management**, v. 55, p. 238–248, 1 set. 2016
- METCALF, L.; EDDY, H. P. *Wastewater Engineering: Treatment and Resource Recovery*. 5. ed. EUA: McGraw-Hill Education, 2013. 2018p.
- MIAO, L.; YANG, G.; TAO, T.; PENG, Y. Recent advances in nitrogen removal from landfill leachate using biological treatments – A review. **Journal of Environmental Management**, v. 235, n. November 2018, p. 178–185, 2019.
- MKHININI, M.; BOUGHATTAS, I.; BOUSSERHINE, N.; BANNI, M. Biochemical and transcriptomic response of earthworms *Eisenia andrei* exposed to soils irrigated with treated wastewater. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 3, p. 2851–2863, 2019.
- MOODY, C. M.; TOWNSEND, T. G. A comparison of landfill leachates based on waste composition. *Waste Management*, v. 63, p. 267–274, 2017.
- MONDELLI, G.; GIACHETI, H. L.; HAMADA, J. Avaliação da contaminação no entorno de um aterro de resíduos sólidos urbanos com base em resultados de poços de monitoramento. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 21, n. 1, p. 169–182, 16 abr. 2016.

MUKHERJEE, S.; MUKHOPADHYAY, S.; HASHIM, M. A.; GUPTA, B. S. Contemporary environmental issues of landfill leachate: Assessment and remedies. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 45, n. 5, p. 472–590, 2015.

NAIKA, S.; JEUDE, J. V. L.; GOFFAU, M.; HILMI, M. DAM VAN, B. **A cultura do tomate: produção, processamento e comercialização**. Tradução de Rob Barnhoorn. 1 ed. Digigrافی: Wageningen, 2006.

NASCIMENTO, I. A.; PEREIRA, S. A.; LEITE, M. B. N. L. Biomarcadores como instrumentos preventivos de poluição. *In*: ZAGATTO, P. A. & BERTOLETTI, E. (Org.). **Ecotoxicologia aquática: Princípios e Aplicações**. São Carlos: RiMa. 2014. p. 413-432.

NAVEEN, B.P.; MAHAPATRA, D. M.; SITHARAM, T.G.; SIVAPULLAIAH, P.V.; RAMACHANDRA, T.V. Physico-chemical and biological characterization of urban municipal landfill leachate. **Environmental Pollution**. v. 220, p. 1-12, 1 jan. 2017.

NEGI, P.; MOR, S.; RAVINDRA, K. Impact of landfill leachate on the groundwater quality in three cities of North India and health risk assessment. **Environment, Development and Sustainability**, 2018.

NIEMEYER, J. C.; CARDOSO, E. J. B. N.; NUNES, M. E. T.; ALVES, P. R. L; MARTINES, A. M; ANDREA, M. M.; BROWN, G. G.; NIVA, C. C. Preparo do substrato teste. *In*: NIVA, C. C.; BROWN, G. G. (Org.). **Ecotoxicologia Terrestre: métodos e aplicações dos ensaios com oligoquetas**. Brasília: Embrapa, 2019.p. 143-151.

OECD. Organization for Economic Co-Operation and Development. **Earthworm acute toxicity test**. Paris, 1984. 9 p. (OECD. Guideline for testing of chemicals, 207).

PABLOS, M. V.; MARTINI, F.; FERNÁNDEZ, C.; BABÍN, M. M.; HERRAEZ, I.; MIRANDA, J.; MARTÍNEZ, J.; CARBONELL, G.; SAN-SEGUNDO, L.; GARCÍA-HORTIGÜELA, P.; TARAZONA, J. V. Correlation between physicochemical and ecotoxicological approaches to estimate landfill leachates toxicity. **Waste Management**, v. 31, n. 8, p. 1841–1847, ago. 2011.

PARMAR, T. K.; RAWTANI, D.; AGRAWAL, Y. K. Bioindicators: the natural indicator of environmental pollution. **Frontiers in Life Science**, v. 9, n. 2, p. 110–118, 2016.

PAN, M.; CHU, L. M. Phytotoxicity of veterinary antibiotics to seed germination and root elongation of crops. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 126, p. 228–237, 2016.

PENG, Y. Perspectives on technology for landfill leachate treatment. **Arabian Journal of Chemistry**. v.10, p. 2567-2574, 1 maio 2017.

PEREIRA, P. C. G.; SOARES, L. O. S.; SALES JÚNIOR, S. F.; SAGGIORO, E. M.; CORREIA, F. V.; Sub-lethal effects of the pesticide imazalil on the earthworm *Eisenia andrei*: reproduction, cytotoxicity, and oxidative stress. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 27, p. 33474–33485, 2020.

PINHO, I. A.; LOPES, D. V.; MARTINS, R. C.; QUINA, M. J. Phytotoxicity assessment of olive mill solid wastes and the influence of phenolic compounds. **Chemosphere**, v. 185, p. 258–267, 2017.

PLAA, G. L. Present status: toxic substances in the environment. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 60, n.7, p. 1010-1016, 1982.

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, p. 188–194, 2017.

RESTREPO, J. J. B.; FLOHR, L.; MELEGARI, S. P.; COSTA, C. H.; FUZINATTO, C. F.; CASTILHOS, A. B.; MATIAS, W. G. Correlation between acute toxicity for *Daphnia magna*, *Aliivibrio fischeri* and physicochemical variables of the leachate produced in landfill simulator reactors. **Environmental Technology (United Kingdom)**, v. 38, n. 22, p. 2898–2906, 2017.

SACKEY, L. N. A.; KOČÍ, V.; VAN GESTEL, C. A. M. Ecotoxicological effects on *Lemna minor* and *Daphnia magna* of leachates from differently aged landfills of Ghana. **Science of the Total Environment**, v. 698, 2020.

SALES JUNIOR, S. F.; MANNARINO, C. F.; BILA, D. M.; TAVEIRA, P. C. E.; CORREIA, F. V.; SAGGIORO, E. M. Lethal and long-term effects of landfill leachate on *Eisenia andrei* earthworms: Behavior, reproduction and risk assessment. **Journal of Environmental Management**, v. 285, n. February, 2021.

SCHIEDECK, G.; MEDEIROS, M. G. de; SCHWENGBER, J. E. **Minhocultura e produção de húmus para agricultura familiar**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2006. 12 p. (Circular técnica, 57).

SCHIEDECK, G.; PASINI, A.; ALVES, P. R. L.; NIVA, C. C.; CANTELLI, K.; BUCH, A. C.; BROWN, G. G.; MARTIN, J. D. Criação e manutenção dos organismos. *In*: NIVA, C. C.; BROWN, G. G. (Org.). **Ecotoxicologia Terrestre: métodos e aplicações dos ensaios com oligoquetas**. Brasília: Embrapa, 2019. p. 167-181.

SILVA JÚNIOR, F. M. R.; FERNANDES, C. L. F.; TAVELLA, R. A.; HOSCHA, L. C.; BAISCH, P. R. M. Genotoxic damage in coelomocytes of *Eisenia andrei* exposed to urban soils. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 842, n. February, p. 111–116, 2019.

SINGH, S.; SINGH, J.; VIG, A. P. Earthworm as ecological engineers to change the physico-chemical properties of soil: Soil vs vermicast. **Ecological Engineering**, v. 90, p. 1–5, 2016.

SISINNO, C. L. S.; NIEMEYER, J. C.; SEGAT, J. C.; OLIVEIRA FILHO, L. C. L.; NIVA, C. C.; BROWN, G. G. Importância e aplicações dos ensaios ecotoxicológicos com oligoquetas. *In*: NIVA, C. C.; BROWN, G. G. (Org.). **Ecotoxicologia Terrestre: métodos e aplicações dos ensaios com oligoquetas**. Brasília: Embrapa, 2019a. p. 45-70.

SISINNO, C. L. S.; SAUTTER, K. D.; NIVA, C. C. Ecotoxicologia terrestre e os instrumentos normativos e regulamentadores no Brasil. *In*: NIVA, C. C.; BROWN, G. G. (Org.). **Ecotoxicologia Terrestre: métodos e aplicações dos ensaios com oligoquetas**. Brasília: Embrapa, 2019b. p. 71-78.

SOROLDONI, S.; SILVA, G.; CORREIA, F. V.; MARQUES, M. Spent lubricant oil-contaminated soil toxicity to *Eisenia andrei* before and after bioremediation. **Ecotoxicology**, v. 28, n. 2, p. 212–221, 2019

ŠOURKOVÁ, M.; ADAMCOVÁ, D.; ZLOCH, J.; SKUTNIK, Z.; VAVERKOVÁ, M. D. Evaluation of the phytotoxicity of leachate from a municipal solid waste landfill: The case study of bukov landfill. **Environments - MDPI**, v. 7, n. 12, p. 1–14, 2020.

SOUSA, J. P.; NIVA, C. C. Dados de ecotoxicidade e desenho experimental. *In*: NIVA, C. C.; BROWN, G. G. (Org.). **Ecotoxicologia terrestre: métodos e aplicações dos ensaios com oligoquetas**. Brasília: Embrapa, 2019. p. 163-166.

SOUZA, D. T.; COUTINHO, T. C.; SANT'ANNA JUNIOR, G. L.; NASCENTES, A. L.; FERREIRA, J. A.; BILA, D. M. Combined treatment of landfill leachate and septic tank sludge using geobag: Laboratory and field study. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 24, n. 6, p. 1127–1137, 2019.

TCHOBANOGLIOUS, G.; THEISEN, H.; VIGIL, S. **Integrated solid waste management: engineering principle and management issues**. McGraw-Hill Science/Engineering/Math, 1993, 978 p.

TRAUTMANN, N.M.; KRASNY, M.E. **Composting in the Classroom - Scientific Inquiry for High School Students**. 1997.

TSARPALI, V.; KAMILARI, M.; DAILIANIS, S. Seasonal alterations of landfill leachate composition and toxic potency in semi-arid regions. **Journal of Hazardous Materials**, v. 233–234, p. 163–171, 2012.

US EPA. United States Environmental Protection Agency. **Ecological effects test guidelines: 850.4200 - Seed germination/root elongation toxicity test**, 1996.

VAVERKOVÁ, M. D.; ADAMCOVÁ, D.; ZLOCH, J.; RADZIEMSKA, M.; BERG, A. B.; VOBĚRKOVÁ, S.; MAXIANOVÁ, A. Impact of municipal solid waste landfill on environment - A case study. **Journal of Ecological Engineering**, v. 19, n. 4, p. 55–68, 2018.

VAVERKOVÁ, M. Impact assessment of the municipal solid landfill on environment: a case study. **Acta scientiarum polonorum - Architectura Budownictwo**, v. 18, n. 2, p. 11–20, 2019.

VAVERKOVÁ, M. D.; ZLOCH, J.; ADAMCOVÁ, D.; RADZIEMSKA, M.; VYHNÁNEK, T.; TROJAN, V.; WINKLER, J.; ĐORĐEVIĆ, B.; ELBL, J.; BRTNICKÝ, M. Landfill Leachate Effects on Germination and Seedling Growth of Hemp Cultivars (*Cannabis Sativa* L.). **Waste and Biomass Valorization**, v. 10, n. 2, p. 369–376, 15 fev. 2019.

VAVERKOVÁ, M. D.; ELBL, J.; KODA, E.; ADAMCOVÁ, D.; BILGIN, A.; LUKAS, V.; PODLASEK, A.; KINTL, A.; WDOWSKA, M.; BRTNICKÝ, M.; ZLOCH, J. Chemical composition and hazardous effects of leachate from the active municipal solid waste landfill surrounded by farmlands. **Sustainability (Switzerland)**, v. 12, n. 11, p. 1–20, 2020.

VAVLIN, V. A.; RYTOV, S.V.; JOKELA, J.; RINTALA, J. A distributed model of solid waste anaerobic digestion sensitivity analysis. **Wiley Periodicals**. v.38, n. 4, p. 147-154, 2003.

WANG, K.; QIAO, Y.; ZHANG, H.; YUE, S.; LI, H.; JI, X.; LIU, L. Bioaccumulation of heavy metals in earthworms from field contaminated soil in a subtropical area of China. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 148, n. November 2017, p. 876–883, 2018.

WANG, Y.; WU, Y.; CAVANAGH, J.; WANG, X.; QIU, J.; LI, Y. Behavior and respiration responses of the earthworm *Eisenia fetida* to soil arsenite pollution. **Pedosphere**, v. 31, n. 3, p. 452–459, 2021.

WDOWCZYK, A.; SZYMAŃSKA-PULIKOWSKA, A. Differences in the composition of leachate from active and non-operational municipal waste landfills in Poland. **Water (Switzerland)**, v. 12, n. 11, p. 1–15, 2020.

YANG, G.; CHEN, C.; YU, Y.; ZHAO, H.; WANG, W.; WANG, Y.; CAI, L.; HE, Y.; WANG, X. Combined effects of four pesticides and heavy metal chromium (VI) on the earthworm using avoidance behavior as an endpoint. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 157, n. October 2017, p. 191–200, 2018.

YOUNG, B. J.; RIERA, N. I.; BEILY, M. E.; BRES, P. A.; CRESPO, D. C.; RONCO, A. E. Toxicity of the effluent from an anaerobic bioreactor treating cereal residues on *Lactuca sativa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 76, n. 1, p. 182–186, 2012.

ZAGATTO, P. A. Ecotoxicologia. In: ZAGATTO, P. A. & BERTOLETTI, E. (Org.). **Ecotoxicologia aquática: Princípios e Aplicações**. São Carlos: RiMa. 2014. p. 1-13.

ŽALTAUSKAITĖ, J.; VAITONYTE, I. Toxicological assessment of closed municipal solid-waste landfill impact to the environment. **Environmental Research, Engineering and Management**, v. 72, n. 4, 16 mar. 2017.

ŽALTAUSKAITĖ, J.; KNIUPIYTĖ, I.; KUGELYTĖ, R. Lead Impact on the Earthworm *Eisenia fetida* and Earthworm Recovery after Exposure. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 231, n. 2, 2020.

ZHANG, M.; LI, M.; WANG, R.; QIAN, Y. Effects of acute ammonia toxicity on oxidative stress, immune response and apoptosis of juvenile yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* and the mitigation of exogenous taurine. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 79, n. May, p. 313–320, 2018.

ZIBETTI, V. K.; NACHTIGAL, G. D. F. LIMA, D. L.; SCHIEDECK, G. Crescimento e reprodução de minhocas em misturas de resíduos orgânicos e efeitos nas propriedades químicas e microbiológicas do húmus. **Interciência**, v. 40, n. January, p. 57–62, 2015.

ZIYANG, L.; YOUCAI, Z.; TAO, Y.; YU, S.; HUILI, C.; NANWEN, Z.; RENHUA, H. Natural attenuation and characterization of contaminants composition in landfill leachate under different disposing ages. **Science of the Total Environment**, v. 407, n. 10, p. 3385–3391, 2009.

ZULKEPLI, M. H. A. B.; SHAHID, N. S. B. M.; ISHAK, A. R. B.; SHAFIE, F. A. B.; YATIM, S. R. B. M.; RAJAN, S. Phytotoxicity of leachate from closed sanitary landfill on Mung Bean Seed (*Vigna radiata*). p. 189–192, 2019.

ZWOLAK, A.; SARZYŃSKA, M.; SZPYRKA, E.; STAWARCZYK, K. Sources of Soil Pollution by Heavy Metals and Their Accumulation in Vegetables: a Review. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 230, n. 7, 2019.