

INTRODUÇÃO

Um dos graves problemas de poluição aquática, são os derramamentos acidentais e despejos de derivados de petróleo que além de causarem prejuízos ambientais e financeiros, mobilizam a opinião pública e demandam ações legais e indenizatórias.

Tal poluição representa um risco significativo para a vida aquática e para o ambiente costeiro (praias, costões rochosos, manguezais, entre outros) onde derramamentos ocorrem mais frequentemente, especialmente em regiões próximas a campos produtores de petróleo, ao longo das principais rotas de petroleiros e perto das principais instalações de manuseio de petróleo tais como portos e refinarias (MARTÍNEZ-GÓMEZ et al., 2010).

A expectativa da Agência Internacional de Energia (AIE) é um aumento de 1,01% da produção de petróleo no mundo em 2014 em relação a 2013, passando de 91,2 milhões de barris/dia para 92,4 milhões de barris/dia (AIE, 2014). De acordo com as projeções feitas pela AIE, a produção brasileira de petróleo vai subir dos atuais 2,2 milhões de barris por dia para 4,1 milhões de barris/dia em 2020, e para 6 milhões de barris/dia em 2035, sendo que o aumento dessa produção, será devido principalmente aos campos de exploração do pré-sal. Em pouco mais de 20 anos, o país vai praticamente triplicar sua produção de petróleo.

Portanto, em que pese às políticas de destinação do óleo para outros usos (petroquímico, etc.) e o empenho crescente para o desenvolvimento de fontes renováveis de energia em todo o mundo e no Brasil, certamente durante os próximos 50 anos e, provavelmente por um tempo mais longo do que isso, assistiremos a um risco crescente de acidentes envolvendo óleo cru e combustíveis derivados.

Devido ao consumo intensificado das sociedades e à logística envolvendo toda a cadeia produtiva do petróleo, o risco de derramamentos de petróleo (óleo cru) e de seus derivados está, portanto, juntamente com a produção e uso, em franco crescimento.

As atividades decorrentes da indústria do petróleo envolvem as etapas de exploração, perfuração, produção, transporte, refino e distribuição, todas essas etapas possuem potencial de causar uma série de impactos ao ambiente.

O transporte é uma das etapas onde o risco de acidentes é maior. O transporte de produtos de petróleo não se limita aos navios; muitas vezes o

transporte é realizado através de barcaças fluviais, gasodutos, ferrovias e rodovias. Acidentes envolvendo armazenamento e transporte terrestre têm resultado em grandes lançamentos no ambiente de petróleo e de seus derivados (API, 1998).

Em 2012, o Brasil contava com 601 dutos destinados à movimentação de petróleo, derivados, gás natural e outros produtos, perfazendo 19,7 mil km de extensão. Destes, 150 dutos, num total de 14,3 mil km, eram destinados ao transporte, e 451 dutos, totalizando 5,4 mil km, à transferência (ANP, 2013).

Segundo a Lei 9.478 de 1997 (Lei do Petróleo), o transporte é a movimentação de petróleo, seus derivados, biocombustíveis ou gás natural em meio ou percurso considerado de interesse geral e a transferência é a movimentação de petróleo, seus derivados, biocombustíveis ou gás natural em meio ou percurso considerado de interesse específico e exclusivo do proprietário ou explorador das facilidades.

Dentre os contaminantes mais frequentemente citados em casos de contaminação de solo e água subterrânea em função do cadastramento, no estado de São Paulo e, mais recentemente, em outros estados como o Rio de Janeiro, estão os derivados de petróleo, particularmente combustíveis compostos por hidrocarbonetos monoaromáticos benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno (BTEX), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) e hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP). A CETESB atualiza anualmente o levantamento sobre áreas contaminadas e, na atualização de dezembro 2012 constatou que de um total de 4.572 áreas contaminadas cadastradas no Estado de São Paulo, aproximadamente 80% eram postos de abastecimento de combustíveis. Esses dados refletiam à época, a obrigatoriedade da vistoria das instalações dos tanques subterrâneos para a obtenção da licença de operação dos postos de gasolina.

Em 2013 o INEA divulgou a relação de áreas contaminadas no estado - 1ª edição do Cadastro de Áreas Contaminadas e Reabilitadas no Estado do Rio de Janeiro - onde se constatou que os postos de combustíveis são os responsáveis por mais da metade desses terrenos contaminados, seguida das atividades industriais, aterros de resíduos e atividades de transporte. Das 160 áreas monitoradas, 67 estão contaminadas, mas ainda não iniciaram nenhum tipo de tratamento no local. Outras 64 estão em tratamento e seis foram recuperadas.

Apesar do vazamento acidental de óleo de dutos ter sido reduzido nas últimas décadas e novas regulamentações relativas à segurança dos petroleiros e à

prevenção da poluição por derramamentos de petróleo no ambiente marinho terem sido adotadas, a crescente demanda por petróleo continua a representar um risco de poluição por hidrocarbonetos e, portanto, de dano potencial para os ecossistemas costeiros e marinhos (MARTÍNEZ-GÓMEZ et al., 2010).

Produtos petrolíferos refinados, como óleo diesel, querosene de aviação e gasolina, são misturas complexas, sendo que o grau de toxicidade desses produtos depende da composição do combustível e da porcentagem de cada constituinte. Alguns compostos são cancerígenos, mutagênicos ou genotóxicos para os seres humanos, animais, plantas e microrganismos. A toxicidade decorrente da contaminação por hidrocarboneto de petróleo é também dependente do tempo transcorrido, das características físicas e químicas do local e da quantidade de produto derramado do vazamento (YANG et al., 2009).

Progressos significativos foram alcançados ao longo da última década quanto ao conhecimento sobre os efeitos agudos de derramamentos de petróleo no ambiente afetando tanto a flora quanto a fauna (NEFF et al., 2000; KOYAMA; KAKUNO, 2004; BARATA et al., 2005; VERA; TAM; PINTO, 2009). Esses estudos são importantes para se avaliar o nível de impacto sobre o ecossistema e as melhores formas de recuperação da área contaminada.

Uma análise da literatura nacional e internacional demonstra a falta de um ponto de vista em comum, a respeito das propriedades tóxicas das diversas frações de petróleo para os organismos vivos. Em trabalhos mais antigos de alguns autores (MIKHAYLOVA, 1986; LASDAY; MARTENS, 1976; LEE; WINTERS; NICOL, 1978) o grau de toxicidade e os efeitos cumulativos do petróleo e seus derivados são considerados como diretamente dependentes da sua solubilidade em água. Os dados nesses estudos evidenciam uma maior toxicidade para os peixes e invertebrados das frações de petróleo contendo quantidades máximas dos hidrocarbonetos aromáticos solúveis em água.

Ao mesmo tempo, foi demonstrado por Bobra et al. (1989) que a fração insolúvel de petróleo tem a maior toxicidade e tal toxicidade depende da distribuição dimensional das partículas de petróleo emulsionado e da temperatura. O componente solúvel é caracterizado por uma toxicidade relativamente baixa, o que muda apenas ligeiramente sob intempéries.

Em um vazamento, tanto na origem quanto no percurso, a gasolina pode percolar solo adentro e atingir a água subterrânea, integrando-se a um fluxo subterrâneo em direção a uma área de alagado ou corpo hídrico receptor. As sondagens e amostragens de matrizes ambientais atingidas são importantes para o diagnóstico ambiental da área contaminada e as ações necessárias para mitigação e remediação da mesma. Em derramamentos recentes, a gasolina derramada apresenta em sua composição, concentrações significativas de compostos monoaromáticos do grupo BTEX. No caso de contaminações antigas e expostas ao intemperismo, os compostos BTEX estariam na sua maior parte ausentes devido aos processos de volatilização, foto-oxidação, restando apenas concentrações bem mais baixas de HTP ou HPA (CORSEUIL; KAIPPER; FERNANDES, 2004).

A possibilidade de ocorrência de vazamentos em oleodutos e tanques subterrâneos de postos de gasolinas é real e por isso, existe a necessidade de monitoramentos periódicos para garantir que possíveis derramamentos não atinjam o lençol freático.

O ambiente aquático é afetado por uma mistura complexa de contaminantes químicos. Segundo Walker et al. (2003) existem poucas pesquisas sobre os efeitos cumulativos de vários tipos de hidrocarbonetos em combinação com outros tipos de contaminantes (pesticidas, metais, fármacos, entre outros) para que se possa avaliar a toxicidade e a resposta dos organismos sob condições experimentais.

Verifica-se uma carência de dados sobre misturas binárias de combustíveis e sobre as mudanças da toxicidade ocorridas em áreas alagadas com contaminação recente e antiga devido ao intemperismo, tendo em vista a dificuldade de intervenção para remediação. Verifica-se, portanto, uma demanda por conhecimentos sobre os efeitos tóxicos decorrentes de contaminações recentes e, principalmente, sobre a toxicidade remanescentes em ecossistemas aquáticos após acidentes envolvendo principalmente misturas, tais como gasolina e álcool.

1. OBJETIVOS

1.1. Objetivo Geral

O presente trabalho teve por objetivo geral, avaliar através de simulação em escala de bancada, a toxicidade aguda em ambiente aquático sobre *Daphnia similis*, observada imediatamente após um derramamento de gasolina, álcool e de mistura de gasolina e álcool, assim como a toxicidade remanescente em ensaios com as frações solúvel e dispersa, após remoção de voláteis em simulação de intemperismo. Simultaneamente, o estudo incluiu o diagnóstico da toxicidade remanescente em uma área alagada com contaminação antiga por gasolina.

1.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a toxicidade aguda da gasolina e álcool separadamente e em misturas sobre *Daphnia similis*;
- Avaliar a toxicidade aguda da Fração Dispersa em Água (FDA) de gasolina isoladamente e em combinação com álcool sobre *Daphnia similis*;
- Avaliar a toxicidade aguda da Fração Solúvel em Água (FSA) de gasolina isoladamente e em combinação com o álcool sobre *Daphnia similis*;
- Determinar e analisar os efeitos interativos dos combustíveis em termos de toxicidade aguda;
- Avaliar a toxicidade aguda remanescente de amostras de água superficial, subterrânea e sedimentos provenientes de uma área alagada com histórico de derramamento de gasolina (*aged contamination*) sobre *Daphnia similis*;
- Discutir os efeitos de uma contaminação antiga sobre uma área impactada por gasolina através do ensaio de toxicidade aguda com *Daphnia similis*.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Contaminação ambiental por derivados de petróleo

O petróleo é encontrado naturalmente em determinadas formações geológicas, como as bacias sedimentares com características muito especiais para ocorrer a formação deste mineral (MILANI et al., 2000). O petróleo é uma mistura complexa de hidrocarbonetos, constituído basicamente por carbono e hidrogênio e em menores proporções há oxigênio, enxofre, traços de nitrogênio e alguns metais. A Tabela 1 mostra a composição dos principais constituintes do petróleo.

Tabela 1 - Composição elementar média do petróleo.

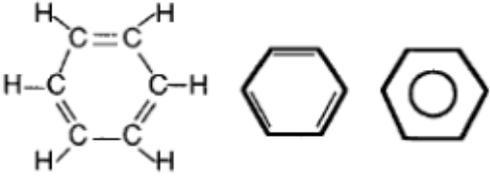
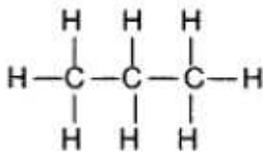
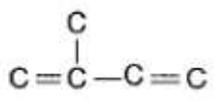
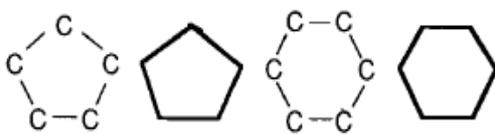
Elemento	% em peso
Carbono	82 a 87%
Hidrogênio	11 a 15%
Oxigênio	0 a 0,5%
Enxofre	0 a 8%
Nitrogênio	0 a 1%
Metais (Fe, Al, Cu, Na, etc)	0,3%

Fonte: BUTT, DUCKWORTH E PERRY (1986).

Os hidrocarbonetos de petróleo possuem em sua constituição átomos de carbono e hidrogênio arranjados em vários tipos de configurações estruturais, podem ser agrupados em quatro classes principais (API, 1999).

A introdução de hidrocarbonetos no ambiente pode ocorrer através de fontes naturais ou antropogênicas. As fontes naturais dos hidrocarbonetos são a queima de florestas, pastagens e atividades vulcânicas. A origem antrópica ocorre através da queima incompleta de combustíveis fósseis, vazamentos acidentais de oleodutos e de tanques de armazenamento superficiais ou subterrâneos de derivados de petróleo, navios e refinarias, entre outros (ALBERS, 2003; HEATH; KOBILIS; SAGER, 1993). A Figura 1 mostra exemplos de estruturas químicas correspondentes a cada classe de hidrocarbonetos.

Figura 1 - Estruturas químicas correspondentes a cada classe de hidrocarbonetos.

Aromáticos	Hidrocarbonetos de cadeia benzênica .	Podem ser monoaromáticos (presença de um anel benzênico), ou policíclicos aromáticos (aqueles com dois ou mais anéis aromáticos).	Estrutura química do benzeno. 
Alcanos	Parafinas ou alifáticos saturados	Hidrocarbonetos de cadeias lineares ou ramificadas.	Exemplo de estrutura química de um alcano. 
Alcenos	Olefinas	Similares aos alcanos, mas com a presença de ligação dupla entre os átomos de carbono.	Exemplo de estrutura química de um alceno. 
Cicloalcanos	Naftas	Hidrocarbonetos de cadeias fechadas (cíclicas) e saturadas.	Exemplo de estrutura química de um cicloalcano. 

Fonte: API (1999).

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) estão diretamente relacionados a efeitos tóxicos nos organismos, sendo que alguns deles estão associados a efeitos mutagênicos, carcinogênicos e teratogênicos. A toxicidade é o resultado da absorção de hidrocarbonetos dissolvidos pelos organismos aquáticos, e isso pode levar a uma grande variedade de respostas fisiológicas (NRC, 2003). O quadro geral é muitas vezes complexo, porque uma série de processos, como a biodegradação, bioacumulação e biotransformação vão determinar a biodisponibilidade e potencial tóxico dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) e outros compostos relacionados ao petróleo (NRC, 2003; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). HPA com peso molecular mais elevado (mais de três anéis aromáticos) são menos solúveis em água do que HPA com dois ou três anéis,

resultando em menor degradabilidade e, conseqüentemente, maior potencial de bioacumulação em cadeias alimentares pelágicas e acumulação nos sedimentos (MARTÍNEZ-GÓMEZ et al., 2010). Moléculas de HPA com baixo peso molecular são consideradas mais tóxicas para os organismos aquáticos do que aquelas com peso molecular mais elevado. Tal efeito é, em parte, ligado à capacidade destes compostos acumularem-se nos tecidos dos organismos. Moléculas com 6 ou mais anéis aromáticos tornam-se incapazes de atravessar as membranas celulares devido ao seu tamanho (OGP, 2005).

A natureza química e física do óleo cru ou dos produtos refinados determina o destino e os efeitos destes compostos em ecossistemas marinhos. Os óleos mais leves irão se espalhar mais rapidamente na superfície da água e podem ser altamente tóxicos para os seres humanos, peixes e outros organismos. Apesar de ter uma taxa rápida de evaporação, estes tipos de óleo não tendem a aderir aos sólidos, mas pode penetrar em materiais porosos incluindo sedimentos argilosos ou arenosos, persistindo em tais matrizes (MARTÍNEZ-GÓMEZ et al., 2010).

Por outro lado, os óleos mais pesados, como são adsorvidos a materiais sólidos, não penetram facilmente em materiais porosos. Estes tipos de óleo são relativamente densos e, muitas vezes afundam. A toxicidade aguda de óleos pesados é muito mais baixa do que a dos óleos mais leves, mas a fauna presente nos sedimentos pode ser sufocada por óleos pesados (MARTÍNEZ-GÓMEZ et al., 2010).

Entre os componentes biológicos dos ecossistemas marinhos, organismos planctônicos são particularmente suscetíveis à poluição do petróleo cru.

Zooplânctons são guiados pelas correntes, alcançando áreas altamente poluídas por derivados de petróleo. Pequenas gotículas de óleo cru (1 a 100 µm de diâmetro) que permanecem na coluna d'água são frequentemente ingeridas por zooplâncton (ALMEDA et al., 2013). Alguns dos componentes do óleo cru, tais como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos são altamente tóxicos para os zooplâncton e passíveis de serem acumulados e transferidos através da cadeia alimentar (BERROJALBIZ et al., 2009; GRAY, 2002).

Gasolina: A gasolina é uma mistura complexa de derivados do petróleo, sendo que os hidrocarbonetos que a compõem são predominantemente alifáticos ou aromáticos. Os compostos alifáticos incluem constituintes como o butano, o penteno e o octano. Os compostos aromáticos incluem o benzeno, o tolueno, o etilbenzeno e

os xilenos (BTEX). A composição da gasolina está relacionada com o petróleo que a originou, com o processamento utilizado para o seu refino e também com a existência ou não de aditivos para minimizar seus impactos sobre o ambiente, aumentar o seu desempenho e reduzir os desgastes mecânicos de motores (PENNER, 2000).

A Tabela 2 apresenta as principais características físico-químicas dos BTEX.

Tabela 2 - Características físico-químicas dos BTEX.

Características	Benzeno	Tolueno	Etilbenzeno	o-Xileno	m-Xileno	p-Xileno
Fórmula química	C ₆ H ₆	C ₇ H ₈	C ₈ H ₁₀			
Massa molar (g/mol)	78	92	106	106	106	106
Sol. em água (mg/L)	1700	515	152	180	160	198
Densidade específica (20°C) (g/mL)	0,8787	0,8669	0,8670	0,8802	0,8642	0,8610
Ponto de ebulição (°C)	80,1	109,6-111,6	136	143-145	139	138
Coef. de partição octanol-água (log K _{ow})	2,13	2,69	3,15	2,77	3,20	3,15
Constante da Lei de Henry (kPa m ³ mol)	0,55	0,67	0,80	0,50	0,70	0,71
Polaridade	Apolar	Apolar	Apolar	Apolar	Apolar	Apolar
Biodegradabilidade	Aeróbia	Aerób/Anaerób	Aeróbia	Aeróbia	Aeróbia	Aeróbia

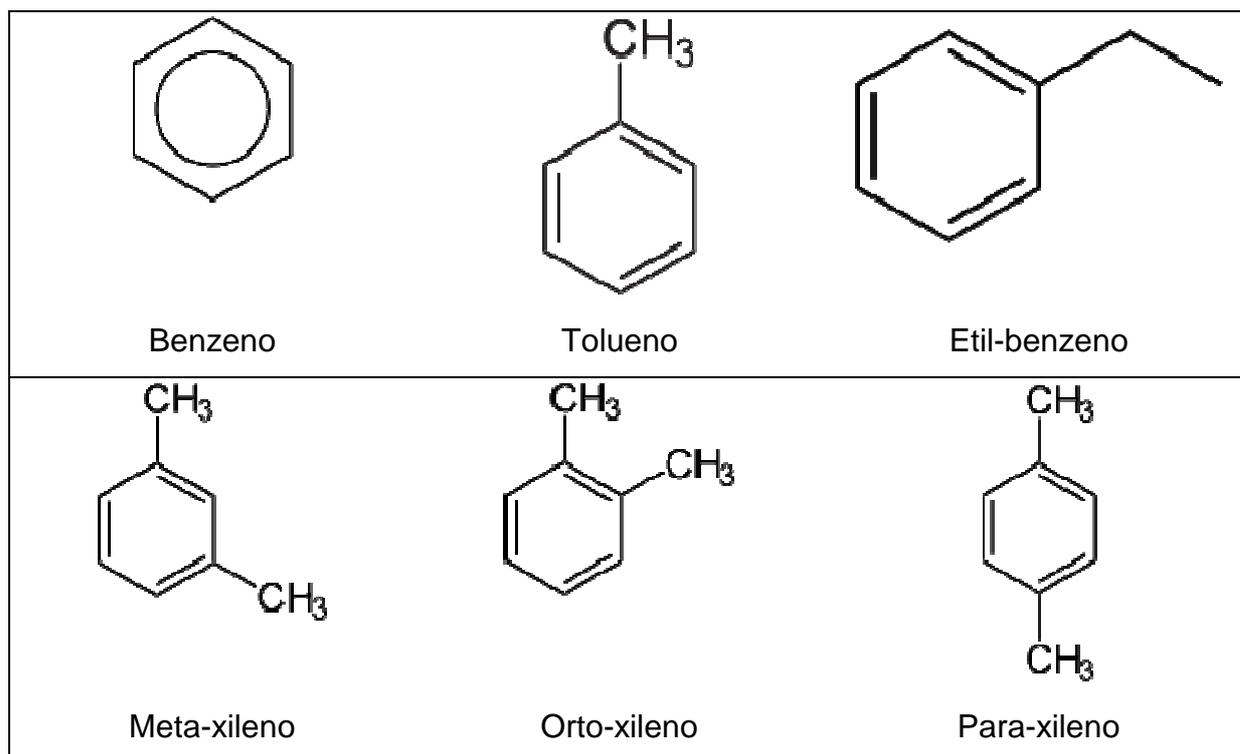
FONTE: CHRISTENSEN; ELTON, 1996.

A Figura 2 apresenta a estrutura química dos hidrocarbonetos monoaromáticos presentes na gasolina.

Quando ocorre um vazamento de gasolina a partir de tanques de armazenamento, forças gravitacionais atuam direcionando o fluido para as camadas mais profundas do solo (SANDRES, 2004).

Em um vazamento de tanques de gasolina em postos de combustíveis, uma das principais preocupações é a contaminação de aquíferos que sejam usados como fonte de abastecimento de água para consumo humano.

Figura 2. Estrutura química dos BTEX.



Os compostos BTEX, por estarem presentes em significativas concentrações na gasolina, e por possuírem uma razoável solubilidade em água, são os contaminantes que primeiro irão atingir o lençol freático. Estes contaminantes são considerados substâncias perigosas por causarem alterações do sistema nervoso central, e por causarem leucemia em exposições crônicas principalmente devido à exposição por via respiratória (BAIRD, 2002; CORSEUIL; MARINS, 1997).

Os compostos BTEX possuem peso molecular baixo, são altamente voláteis e degradados rapidamente na coluna d'água, possuem pouca afinidade com tecidos lipídicos de organismos aquáticos e sorção à matéria orgânica (OGP, 2005). Em geral, a toxicidade aumenta com o aumento do peso molecular, no entanto, devido à rápida perda destes componentes na água devido à alta volatilização dos compostos, a exposição dos organismos é baixa (OGP, 2002).

Dentre os BTEX, o benzeno é considerado o mais tóxico e o composto com o mais baixo padrão de qualidade de água, 5 µg/L, segundo as normas da Portaria nº 2914/2011 do Ministério da Saúde. São apresentados na Tabela 3 os valores máximos permitidos para os BTEX pelas principais legislações existentes no país. A Portaria nº 2914/2011 do Ministério da Saúde, dispõe sobre a qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade; o CONAMA 357/2005 dispõe

sobre a classificação e diretrizes ambientais para o enquadramento dos corpos de água superficiais e o CONAMA 430/2011 dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes.

Tabela 3 - Valores máximos definidos pela legislação brasileira para os BTEX.

Parâmetros	Portaria MS 2914/2011	CONAMA 357/2005 Classe 1 Águas doces	CONAMA 430/2011
	Valor máximo	Valor máximo	Valor máximo
Benzeno	5 µg/L	5 µg/L	1,2 mg/L
Etilbenzeno	200 µg/L	90 µg/L	0,84 mg/L
Tolueno	170 µg/L	2,0 µg/L	1,2 mg/L
Xileno	300 µg/L	300 µg/L	1,6 mg/L

Fonte: CONAMA, 2005 e 2011; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011.

No que diz a respeito da tabela acima, o padrão de potabilidade definidos pelo Ministério da Saúde, para os BTEX, são de grande importância, visto que, a contaminação de águas subterrâneas por derivados de petróleo constitui uma verdadeira ameaça para a população, uma vez que a pluma de óleo chegando ao lençol freático pode impossibilitar a exploração destes, afetando o abastecimento dos mananciais.

Em um vazamento por derivados de petróleo no solo, o comportamento dos compostos é conduzido por diferentes fatores que incluem propriedades físico-químicas, o processo de transporte e migração dos contaminantes e fatores ambientais como temperatura e precipitação (FATORELLI, 2005; KAIPPER, 2003). Algumas destas propriedades físico-químicas dos compostos são: a solubilidade aquosa, pressão de vapor, a constante da lei de Henry (K_H), o coeficiente de partição solo-água (K_d), o coeficiente de partição água-octanol (K_{ow}), o coeficiente de partição carbono orgânico-água (K_{oc}), a densidade e viscosidade, propriedades estas utilizadas para determinar os coeficientes de partição dos contaminantes orgânicos entre as diferentes fases do sistema (KAIPPER, 2003).

No solo, os componentes voláteis, como BTEX, podem ser volatilizados para a fase gasosa e, a seguir, podem ser perdidos para a atmosfera, ou adsorvidos nos sólidos dos solos, ou dissolvidos na solução do solo ou na água subterrânea (FERREIRA, 2003). O volume de combustível retido pelo solo irá determinar tanto o grau de contaminação (residual) quanto o potencial de transporte e a contaminação das águas subterrâneas (DUARTE, 2003).

Segundo Oliveira (1992), a quantidade de produto que irá atingir o lençol freático dependerá da sua quantidade inicial, da distância vertical que separa o ponto de vazamento ou derramamento do lençol freático e da quantidade residual do produto que ficará retida pelo solo.

Dutos subterrâneos representam um desafio único para o estado, pois, milhares de quilômetros de dutos são abandonados e enterrados, muitas vezes atravessando propriedades particulares, estaduais e federais. Muitos destes oleodutos tornaram-se parcialmente expostos, criando riscos potenciais de vazamento que podem alcançar o aquífero e contaminá-lo (WOOTTEN, 2009).

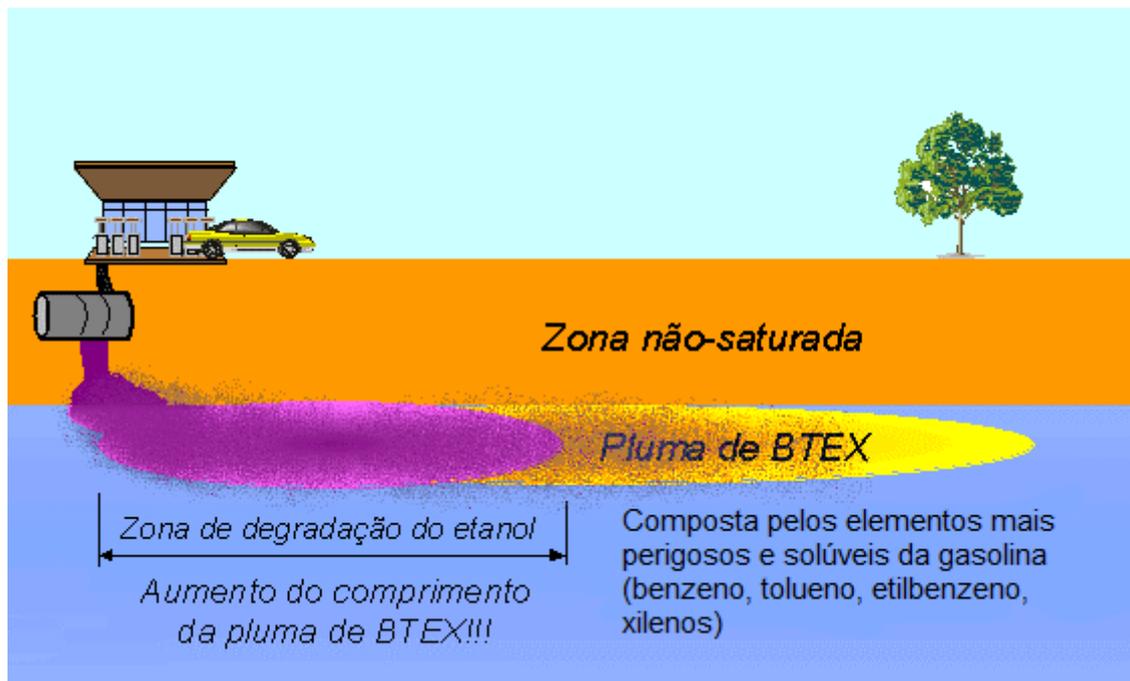
2.2. Efeito da presença do álcool na gasolina

Nas indústrias petrolíferas e químicas, nas companhias de distribuição, e nos postos de gasolina onde os tanques subterrâneos de armazenamento de óleo diesel são geralmente instalados próximos aos tanques de álcool, em caso de derramamento ou vazamento, grandes proporções de óleo diesel poderão entrar em contato com o álcool, e as interações entre os hidrocarbonetos e o etanol podem afetar o comportamento daqueles no sistema. A adição de etanol aumenta a solubilidade dos hidrocarbonetos em água e a mobilidade dos BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno) dissolvidos na água subterrânea, além de dificultar a biodegradação natural (Figura 3) (FERNANDES; CORSEUIL, 1996; FERNANDES, 1997; CORSEUIL; MARINS, 1997; KULKAMP, 2003).

No Brasil é adicionada à gasolina uma proporção de 20 a 25% de álcool. Este é utilizado para aumentar a octanagem da gasolina, diminuindo assim a quantidade de monóxido e dióxido de carbono na atmosfera. No entanto, o etanol pode aumentar a massa dos hidrocarbonetos na água subterrânea devido ao efeito de cossolvência e é um substrato preferencial para os microrganismos do aquífero,

dificultando a ação de transformação dos contaminantes BTEX (FERNANDES; CORSEUIL, 2001).

Figura 3 – Aumento da solvência do BTEX em virtude da presença do álcool etílico.



Fonte: SINMEC, 2013.

O álcool é solúvel em água (um composto polar) e em gasolina (formada predominantemente por compostos apolares). Devido a tal propriedade, o álcool é classificado como um cossolvente. Isto implica que, em uma mistura bifásica contendo água e gasolina, ao misturar-se álcool, este será distribuído em proporções distintas entre a fase gasolina e a fase aquosa. Esta distribuição é razoavelmente complexa, pois a presença de etanol na água faz com que a solubilidade dos compostos da gasolina aumente. Logo, numa mistura bifásica de água e gasolina contendo álcool tem-se uma fase aquosa contendo água, etanol e gasolina e uma fase “oleosa” contendo gasolina, álcool e água, sendo que a partir de uma determinada proporção de etanol no sistema água-gasolina-etanol, este passa a ser unifásico (OLIVEIRA, 2000).

A presença do álcool na gasolina provoca o rompimento das ligações intermoleculares dos hidrocarbonetos, facilitando sua evaporação, e conseqüentemente aumentando a pressão de vapor da mistura (CRUZ; CARVALHO; STRAGEVITCH, 2003).

2.3. A importância do biomonitoramento e dos bioindicadores

De acordo com Markert et al. (1999), o biomonitoramento é uma abordagem que permite observar o impacto de fatores externos sobre os ecossistemas e seu desenvolvimento ao longo de um período, ou de determinar diferenças entre um local e outro.

Ainda segundo Cairns e Van der Schalie (1980) o biomonitoramento pode ser definido como o uso sistemático de respostas biológicas para avaliar mudanças no ambiente, com a intenção de estabelecer um programa de controle de qualidade. Quando realizado com regularidade, o emprego sistemático de organismos no processo de biomonitoramento oferece a oportunidade de avaliar o impacto de contaminantes para o ambiente aquático de forma mais realista (CAIRNS, 1982).

Um bioindicador é um organismo (ou parte dele ou ainda um grupo de organismos), que dará informações sobre a qualidade do ambiente. Assim, o uso de bioindicadores deve ajudar a descrever o ambiente natural, detectar e avaliar os impactos de origem antropogênica para avaliar a restauração ou recuperação do mesmo (MARKERT, 1995).

Bioindicadores e, em particular, organismos como peixes são sensíveis ao impacto de misturas de produtos químicos em um determinado ecossistema aquático. Contaminantes causam geralmente, uma gama de efeitos e respostas.

Vários contaminantes tóxicos e bioacumulativos são encontrados em concentrações muito baixas na água, e, frequentemente, em níveis elevados nos sedimentos. Avaliações de risco com base apenas em dados de análises de água podem ser enganosas. Por outro lado, os dados obtidos das análises de sedimentos podem não ser representativos das concentrações dos contaminantes na coluna de água e não podem dar informações sobre os padrões de contaminação nos níveis mais altos da cadeia alimentar (BINELLI; PROVINI, 2003).

Em estudos de contaminação de ambientes aquáticos, tanto a coluna d'água quanto os sedimentos são compartimentos importantes para avaliação da toxicidade. Um bioindicador ideal deve apresentar as seguintes características:

- Sensibilidade alta a diversos agentes químicos;
- Facilmente cultivável em laboratório;
- Espécie de pequeno porte e ciclo de vida curto;
- Distribuição ampla ou cosmopolita;

- Conhecimentos disponíveis em detalhe sobre o ciclo de vida da espécie;
- Espécies com estabilidade genética que possibilitem a obtenção de lotes uniformes de organismos.

A Tabela 4 apresenta os organismos mais utilizados de diferentes grupos para ensaios ecotoxicológicos.

Tabela 4 - Exemplos de organismos bioindicadores utilizados na avaliação dos efeitos tóxicos das substâncias no ambiente aquático.

Grupo de organismos		Exemplos de organismos
Bactérias		<i>Vibrio fischeri</i> *
Algas	Microalgas	<i>Scenedesmus sp.</i> <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> <i>Chlorella vulgaris</i> <i>Skeletonema costatum</i> *
	Macroalgas	<i>Ulva lactuca</i> * <i>Macrocystis pyrifera</i> *
Rotífero		<i>Brachionus plicatilis</i> #
Anostráceo		<i>Thamnocephalus platyurus</i>
Equinodermos		<i>Lytechinus variegatus</i> *
Crustáceos	Microcrustáceos	<i>Daphnia sp.</i> <i>Ceriodaphnia dubia</i> <i>Artemia salina</i> * <i>Gammarus sp.</i> <i>Mysidium sp</i> *
	Mexilhões Ostra	<i>Perna perna</i> * <i>Mytilus edulis</i> * <i>Crassostrea virginica</i> *
Peixes		<i>Danio rerio</i> <i>Pimephales promelas</i> <i>Poecilia vivípara</i> # <i>Oreochromis niloticus</i>

* Espécies de ambiente marinho; # Espécies eurialinas.

Algumas espécies bioindicadoras são notoriamente utilizadas por possuírem métodos de cultivo e de ensaios padronizados. No Brasil, as normas recomendadas para ensaios ecotoxicológicos são da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), porém, existem normas padronizadas para ensaios ecotoxicológicos pertencentes a outras organizações, tais como Sociedade Americana para Materiais

e Testes (ASTM), a Organização Internacional para Padronização (ISO), a Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) e a Agência Americana de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US EPA).

2.4. A ecotoxicologia

O principal objetivo da Ecotoxicologia é estudar distúrbios estruturais e funcionais induzidos a curto, médio e longo prazo por fatores de contaminação nos ecossistemas, incluindo fatores físicos, químicos, e, por vezes, biológicos que resultam essencialmente de efeitos diretos e indiretos das atividades antropogênicas (BOUDOU; RIBEYRE, 1997).

De acordo com Costa et al. (2008), os ensaios de toxicidade são uma importante ferramenta para avaliar a qualidade das águas e a carga poluidora de efluentes, uma vez que somente as análises físico-químicas tradicionalmente realizadas, como Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), Demanda Química de Oxigênio (DQO), sólidos suspensos, análise de metais e outras de caráter orgânico e inorgânico, não são suficientes para avaliar os efeitos da contaminação sobre os sistemas biológicos. Os resultados das análises químicas por si só não mostram o impacto ambiental causado pelos contaminantes porque não avaliam os efeitos sobre o ecossistema. Somente o estudo de sistemas biológicos (organismos ou partes deles) pode detectar os efeitos tóxicos das substâncias. A aplicação dos ensaios de toxicidade na análise ambiental é bastante abrangente e sua importância aumenta na proporção que cresce a complexidade das transformações químicas no ambiente (MAGALHÃES; FERRÃO-FILHO, 2008).

Apesar da sua importância, entretanto, os ensaios de toxicidade não substituem as análises químicas tradicionais. Enquanto as análises químicas identificam substâncias e quantificam suas concentrações, os ensaios ecotoxicológicos avaliam os efeitos das substâncias sobre os organismos. Desta forma, as análises químicas e os ensaios de toxicidade são complementares (COSTA et al., 2008).

A ecotoxicologia aquática tem como objetivo avaliar os efeitos de substâncias tóxicas sobre os organismos pertencentes a ecossistemas aquáticos. Envolve o transporte, distribuição, a transformação e o destino final dos contaminantes no

ambiente aquático. Estas etapas dependem principalmente das propriedades do ambiente e das características do contaminante (RAND; WELLS; McCARTY, 1995).

De acordo com Sinderman (1996), as respostas da biota aos contaminantes são distribuídas no tempo, algumas ocorrendo imediatamente após o evento poluidor outras respondem ao poluente depois de um longo tempo de estímulo.

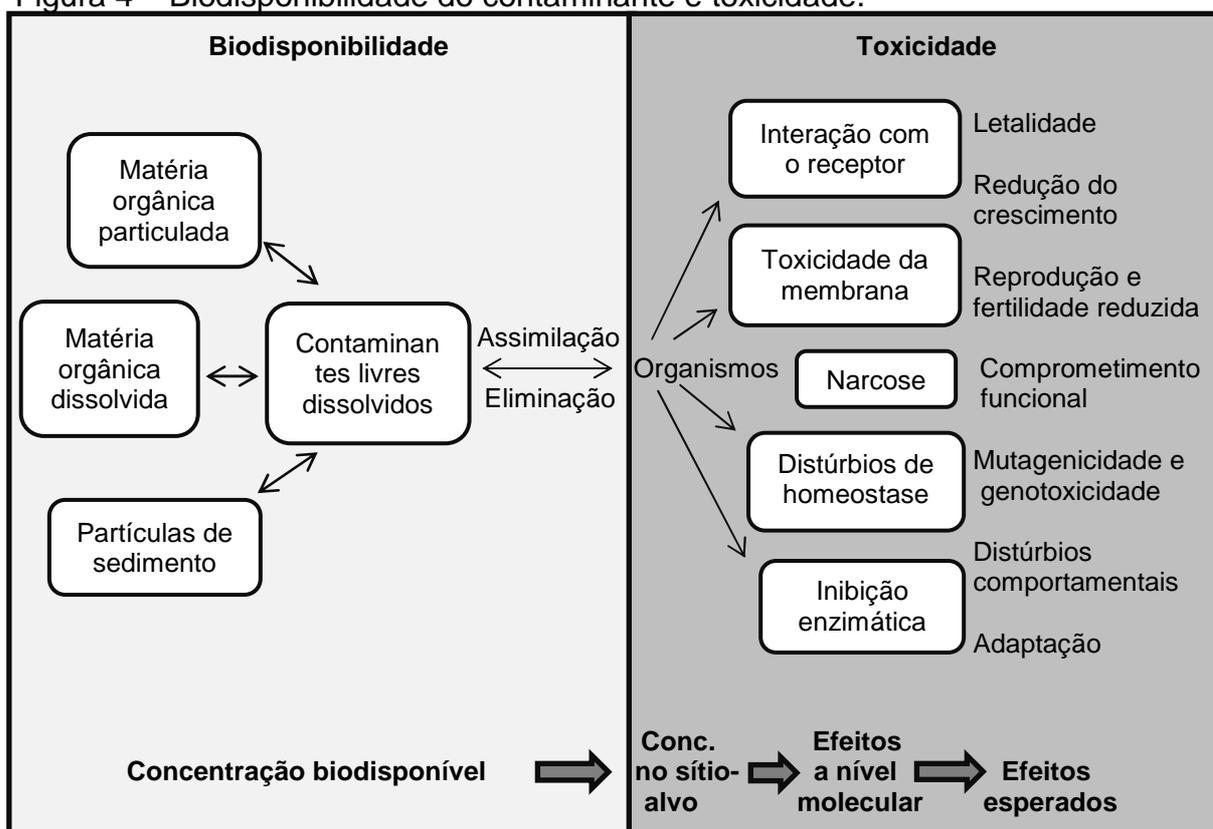
Muito dos ensaios de toxicidade com organismos aquáticos estão relacionados com a absorção direta de substâncias químicas da água. Os produtos químicos podem estar em solução, em suspensão ou ambos (WALKER et al., 1996).

Contaminantes solúveis em água são introduzidos nos organismos aquáticos por meio da superfície do corpo (exposição dérmica) e pelos tecidos respiratórios. Contaminantes presentes nos alimentos podem ser ingeridos (exposição oral) e absorvidos pelo trato gastrointestinal, enquanto que contaminantes adsorvidos em partículas e sedimentos podem penetrar no organismo por exposição dérmica ou respiratória, à medida que vão sendo desorvidos para a água que está em contato com o organismo aquático (HOLT, 2000; HERMENS; HERINGA; LAAK, 2007).

Segundo Escher et al. (1997) a biodisponibilidade dos contaminantes químicos é dependente de processos biogeoquímicos e fisiológicos, é um importante fator, frequentemente negligenciado nas avaliações ecotoxicológicas e nas análises de risco. A fração biodisponível é crítica para a absorção e, finalmente para a concentração do contaminante nos sítios-alvo. Os efeitos ecotoxicológicos são dependentes da fração biodisponível dos contaminantes e as concentrações nos organismos induzem efeitos moleculares que desencadeiam uma variedade de manifestações tóxicas nos organismos (Figura 4).

A absorção e o efeito de substâncias químicas nos organismos não são determinados unicamente pela concentração biodisponível desta substância, mas, também por fatores biológicos, principalmente a suscetibilidade dos organismos. Diferenças na suscetibilidade entre as espécies ou populações da mesma espécie estão relacionadas com a diferença na morfologia, estágio de desenvolvimento, sexo, genótipo, atividade metabólica e da história individual. Além disso, os organismos podem evoluir gerando mecanismos de proteção em resposta à contínua exposição a elevadas concentrações de uma substância química, e isto, pode resultar em uma tolerância aumentada para o produto químico (ESCHER et al., 1997).

Figura 4 – Biodisponibilidade do contaminante e toxicidade.



Fonte: Adaptado de ESCHER et al. (1997).

Efeitos da contaminação por hidrocarbonetos sobre o zooplâncton são dependentes de fatores intrínsecos (fase da vida da espécie, tamanho) e extrínsecos (concentração de óleo, tempo de exposição, temperatura, salinidade, radiação UV, uso de dispersantes químicos) (SAIZ et al., 2009; JIANG et al., 2010).

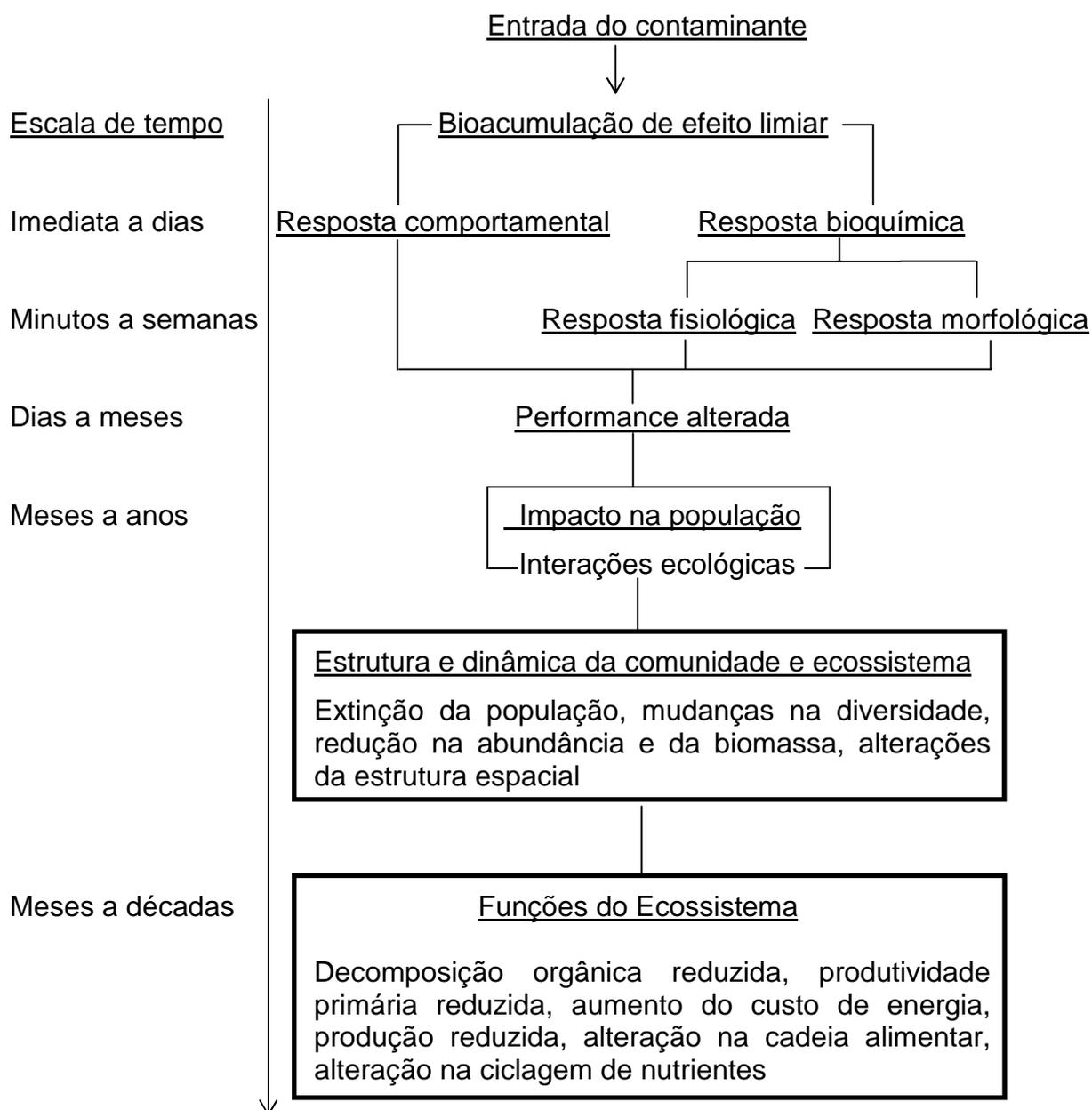
Os hidrocarbonetos lipofílicos da fração solúvel em água se acumulam no fitoplâncton causando efeito tóxico direto além de bloquearem a fotossíntese (JIANG et al., 2010; PELLETIER et al., 2006).

Durante uma exposição breve e limitada a substâncias tóxicas, peixes respondem em um nível sub-celular, mas geralmente os organismos podem compensar o efeito tóxico, e sua saúde não ser afetada. Entretanto, exposições prolongadas podem induzir uma sequência de alterações funcionais e estruturais prejudicando suas funções vitais (CHOVANEC; HOFER; SCHIEMER, 2003).

Impactos ecotoxicológicos ao nível de ecossistema podem levar de meses a décadas (exemplo: contaminantes orgânicos) e causar sérios distúrbios ecológicos. Conhecimento básico dos processos ecológicos é essencial em qualquer estudo ecotoxicológico. Conhecer estes processos são a base de referência para definir o

grau de impacto do ecossistema, a sua reversibilidade e estimar qualitativa e quantitativamente os riscos de média a longa duração (FENT, 2003).

Figura 5 - Cronologia de efeitos induzidos após a exposição a contaminantes tóxicos, com mudanças na comunidade e na estrutura do ecossistema.



Fonte: Adaptado de SHEEHAN (1984).

A entrada de um contaminante tóxico em um determinado ecossistema pode induzir respostas comportamentais e bioquímicas em um organismo. Segundo Sheehan (1984), estas respostas são baseadas em efeitos biológicos diretos, incluindo a mortalidade das diferentes fases da vida e as perturbações dos ciclos

reprodutivos e os efeitos biológicos indiretos, essencialmente aqueles baseados na interação espécie-espécie, que desempenham um papel fundamental na estrutura e função dos sistemas (relações tróficas através da interação predador e presa, perturbação dos habitats).

A maioria dos ecossistemas aquáticos experimentam algum nível de exposição crônica ou subletal devido às inúmeras emissões de contaminantes que são despejadas diretamente neste ambiente, cujas fontes podem ser classificadas em pontuais ou não pontuais (SCHLENK et al., 1996).

De acordo com Costa et al. (2008), as emissões de fontes pontuais são facilmente detectadas e controladas e, geralmente, resultam em descargas diretas dos contaminantes nos corpos d'água. Já as emissões não pontuais são de difícil controle, variam com o tempo e o espaço e podem envolver rotas que resultem na deposição parcial dos contaminantes antes deles atingirem os corpos hídricos.

Ao nível genético, os derivados do petróleo promovem a diminuição na síntese de ácidos nucleicos e a redução no teor de proteínas em fitoplânctons, danificando e impedindo a replicação do DNA (JIANG et al. 2010). A exposição aos HPA, por exemplo, altera e reduz a expressão de genes responsáveis pela produção de pigmentos fotossintéticos (clorofilas e carotenóides) (ROMERO-LOPEZ; LOPEZ-RODAS; COSTAS, 2012) e pelas proteínas necessárias para a divisão celular em diatomáceas (GILDE; PINCKNEY, 2012), além de inibir a replicação do DNA (JIANG et al., 2010). As bifenilas policloradas (PCB) e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) são potentes indutores da enzima CYP1A em peixes (STEGEMAN; HAHN, 1994) e em outros animais aquáticos. A indução de CYP1A pode ser considerada como um processo que resulta numa alteração do metabolismo e em distúrbios do equilíbrio hormonal, mas também como um processo adaptativo à exposição crônica a essas substâncias. A indução de CYP1A pode ser utilizada como um biomarcador para a avaliação ecotoxicológica de amostras ambientais (ESCHER et al. 1997). Os peixes são capazes de transformar ou metabolizar HPA rapidamente através da ativação de um sistema de detoxificação (enzimas oxidase de função mista) (OGP, 2005).

Em estudos com peixes expostos ao petróleo ou seus derivados foram observados alterações branquiais, desorganização das lamelas secundárias, proliferação celular, descolamento de epitélio branquial, fusão lamelar, descolamento de epitélio e hiperplasias (AKAISHI et al., 2004; NERO et al., 2006).

Em animais como ratos, os hidrocarbonetos interagem com o DNA resultando em mutações e câncer. Existem fortes evidências de que este potencial esteja relacionado à sua biotransformação, com a formação de subprodutos altamente reativos que podem ligar-se ao DNA e a proteínas, com interferência nos processos de reparo e replicação celular, resultando em danos cromossômicos e muitas vezes carcinogênese (KODO FILHO, 2006). Além disso, desencadeiam a produção de metabólitos altamente reativos e por possuírem uma alta afinidade com a molécula de DNA, realizam pontes covalentes com essa, resultando na formação de adutos (PISONI et al., 2004). As alterações nas cadeias de DNA podem causar severas mutações e induzir a uma cascata de eventos subsequentes levando, dentre outros a morte celular, disfunções na replicação e reparação das fitas ou mesmo a um processo descontrolado de divisões celulares (HIURA et al., 1999; VERNIER, 2001). Os estudos em toxicologia aquática são qualitativos e quantitativos em relação aos efeitos tóxicos sobre os organismos aquáticos. Os efeitos tóxicos podem incluir efeitos letais (mortalidade) e efeitos subletais, dentre eles, alterações no crescimento, desenvolvimento e reprodução, respostas farmacocinéticas, patologia, bioquímica, fisiologia e comportamento. Os efeitos podem ser expressos através de critérios mensuráveis como o número de organismos mortos, alterações no tamanho e peso, percentagem de ovos eclodidos, entre outros (WALKER et al., 1996).

Os efeitos crônicos do óleo sobre espécies de coluna de água incluem a interrupção neurossensorial, anormalidades comportamentais e de desenvolvimento e fertilidade reduzida (GREEN; TRETT, 1989; RATUSHNYAK et al., 2009). O petróleo derramado na superfície da água também limita a troca de oxigênio, o revestimento das brânquias dos organismos aquáticos, pode causar lesões patológicas em superfícies respiratórias, e assim, gerar problemas graves para os organismos aquáticos (BHATTACHARYYA; KLERKS; NYMAN, 2003).

2.5. Ensaios de toxicidade

2.5.1. Ensaios de toxicidade aguda

Ensaios de toxicidade são experimentos biológicos com diferentes espécies na presença de substâncias químicas ou amostras ambientais. Eles são requeridos para avaliação de risco de produtos químicos novos ou preexistentes, assim como o

monitoramento da qualidade ambiental (água, solo, sedimento) (RATTE, HAMMERS-WIRTZ; CLEUVERS, 2003).

Os ensaios de toxicidade aguda são desenvolvidos para determinar a toxicidade relativa de uma substância sobre um organismo aquático selecionado, exposto a várias concentrações desta substância, em um curto período de tempo. São caracterizados por abrangerem um curto período do ciclo de vida dos organismos-teste, e, portanto, um período variável para cada espécie. O tempo de exposição pode compreender de minutos (como o caso da bactéria *Vibrio fischeri*) a 96 horas.

Os ensaios de toxicidade aguda são úteis porque estabelecem uma referência inicial e expressam o potencial tóxico relativo (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008). Apresentam algumas vantagens, pois, são facilmente interpretáveis, rápidos, fáceis de execução, possuem curta duração e baixo custo.

Como desvantagem encontra-se o fato de que estes ensaios avaliam os efeitos quantitativos, não evidenciando efeitos que poderiam ocorrer em tempos mais prolongados de exposição, tais como o de bioacumulação, efeitos sobre a reprodução e o crescimento.

Os efeitos avaliados são, por exemplo, mortalidade, no caso de peixes; imobilidade, no caso de invertebrados; e taxa de luminescência, no caso de *Vibrio fischeri*. O resultado é expresso em Concentração Efetiva Mediana - CE50 (caso do ensaio com o microcrustáceo *Daphnia*) ou Concentração Letal - CL50 (caso do ensaio com *Danio rerio*). De acordo com a NBR 12.713 (2009), a CE50 representa a concentração que causa efeito agudo a 50% dos organismos expostos a uma amostra em um período de tempo determinado.

O objetivo deste ensaio é determinar a concentração do material (substância química ou efluente) que produz um efeito deletério na população exposta durante um curto período de tempo sob condições controladas (RAND; WELLS; McCARTY, 1995).

2.5.2. Sistemas de exposição

A seleção do tipo de ensaio vai depender dos objetivos do ensaio, dos recursos disponíveis, das exigências dos organismos-teste, e das características das substâncias-teste. A Tabela 5 mostra diferentes sistemas de exposição com suas vantagens e desvantagens nos ensaios de toxicidade.

Tabela 5 – Sistemas de exposição nos ensaios de toxicidade em laboratório.

Exposição	Descrição	Vantagens	Desvantagens
Sistema Estático	Os organismos são expostos à mesma solução durante todo o período do ensaio, ou seja, não há renovação da solução.	Simples e de baixo custo; Necessidade de poucos recursos (equipamento, mão de obra, espaço), o que permite a realização de uma quantidade maior de ensaios; Necessidade de um menor volume de amostra em comparação com o sistema semi-estático.	A possível perda de substâncias tóxicas através da volatilização; A depleção de oxigênio dissolvido pode resultar em uma elevada demanda química/ bioquímica de oxigênio (DQO/DBO); Geralmente apresenta menor sensibilidade que o sistema semi-estático, pois as substâncias tóxicas podem sofrer degradação ou serem adsorvidas.
Sistema Semi-Estático	Os organismos-teste são expostos a uma solução-teste a qual é renovada (trocada), em intervalos de tempo pré-determinados, geralmente a cada 48 horas.	Devido às renovações das soluções-teste, reduz a perda da substância por degradação e/ou volatilização.	Os ensaios são mais trabalhosos em relação ao ensaio estático; Manuseio constante dos organismos, podendo causar estresse.
Sistema de Fluxo Contínuo	As soluções-teste fluem continuamente através dos recipientes onde estão os organismos-teste. O fluxo deve ser capaz de manter a concentração da solução-teste constante.	Mantém constante a concentração da solução-teste o que fornece a melhor estimativa da toxicidade da substância testada; Assegura a saúde dos organismos-teste, pois, elimina o problema da acumulação da amônia e depleção do oxigênio dissolvido.	Grande complexidade de operação e manutenção dos equipamentos; Alto custo.

Fonte: USEPA, 2002; ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008.

2.6. Efeito das misturas das substâncias

A exposição às misturas pode gerar interações toxicológicas, onde o contato com duas ou mais substâncias químicas resulta em uma resposta biológica quantitativa ou qualitativamente diferente da que seria esperada pela ação de cada uma das substâncias químicas separadamente. A mistura de substâncias pode causar efeitos aditivos, sinérgicos, de potenciação ou antagônicos (RAND; WELLS; McCARTY, 1995).

Em ecossistemas contaminados, a biota ali existente está geralmente exposta não a um único contaminante, mas sim a uma diversidade de diferentes compostos simultaneamente. Segundo Rand, Wells e McCarty (1995), alguns efeitos importantes que podem ocorrer quando da exposição simultânea são:

- Efeitos sinérgicos: ocorrem quando o efeito da combinação de dois contaminantes é muito maior do que a soma dos efeitos dos contaminantes individuais aplicados isoladamente;
- Efeitos de potencialização: ocorrem quando um contaminante tem efeito tóxico somente quando é aplicado conjuntamente com outro contaminante;
- Efeitos antagônicos: ocorrem quando dois contaminantes, aplicados juntos, antagonizam um ao outro, isso é, a combinação deles é menor do que a soma dos contaminantes individuais aplicados isoladamente;
- Efeitos aditivos: ocorre quando o efeito combinado de dois contaminantes é igual à soma dos efeitos dos contaminantes individuais aplicados separadamente.

2.7. Contaminação recente *versus* antiga de um derramamento de petróleo e derivados

Em um derramamento de petróleo e derivados o entendimento detalhado dos processos faz-se necessário, para que se possa prever a extensão dos danos ambientais e desenvolver estratégias eficientes para a recuperação do ecossistema atingido (GONZÁLEZ et al., 2006).

Logo após a ocorrência de um derramamento, uma grande variedade de processos químicos, físicos e biológicos começam a agir sobre o contaminante. O conjunto de processos físicos, químicos e biológicos é denominado intemperismo e

agem modificando a composição, comportamento, rotas de exposição e toxicidade do contaminante em foco. Os processos predominantes que influenciam o comportamento do contaminante derramado, particularmente petróleo e derivados constituídos primordialmente por hidrocarbonetos são espalhamento, advecção, evaporação, dissolução, dispersão natural, emulsificação, foto-oxidação, sedimentação e biodegradação (API, 1999; NEFF et al., 2000). Para a maioria dos produtos, esses processos são os mesmos em água doce e em água do mar. No entanto, águas mais turbulentas (corredeiras e vertedouros) com cargas mais elevadas de sedimentos transportados, tendem a misturar e dispersar o contaminante derramado na coluna de água (STEEN et al., 1999). A Figura 6 representa um esquema dos principais processos de intemperismo.

Figura 6 - Destino do contaminante (petróleo ou derivados) derramado, mostrando os principais processos de intemperismo.



Fonte: Adaptado de ITOPI (2011).

Os componentes mais leves de petróleo ou derivados evaporam para a atmosfera na sua maior parte. A quantidade e a velocidade da evaporação vão depender da volatilidade dos componentes do contaminante. Um óleo com uma grande percentagem de compostos leves e voláteis evapora mais rápido comparado a um óleo formado predominantemente de compostos mais pesados. Por exemplo, gasolina, querosene e óleo diesel, todos os produtos leves, tendem a evaporar em poucos dias. De um modo geral, em condições de clima temperado, os componentes

do óleo com um ponto de ebulição inferior a 200 ° C tendem a evaporar dentro das primeiras 48 h. A evaporação pode aumentar à medida que o óleo se espalha, devido ao aumento da área de superfície da mancha (LEE, 1980; API, 1999; ITOFF, 2011).

Segundo Douglas et al. (2002), no derramamento do oleoduto OSSA II, na Bolívia em 2000, houve uma perda rápida e substancial de benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (BTEX), decorrente principalmente da evaporação sofrida pela mancha que fez com que houvesse uma redução do risco ambiental inicial. Entretanto, redução não implica em desaparecimento total.

Uma vez derramado no ambiente aquático, o combustível sofrerá alterações em relação à sua composição original, devido a uma combinação de processos físicos, químicos e biológicos denominados de intemperismo. Este se inicia imediatamente após o derramamento e evolui a taxas variáveis, dependendo do tipo de óleo e das condições ambientais existentes.

A evaporação é o processo básico do intemperismo envolvido na remoção natural do óleo na superfície da água. A perda do óleo para o meio ambiente através da evaporação pode ser ainda maior para produtos refinados como a gasolina devido ao alto percentual de compostos orgânicos leves (API, 1999). Este processo está relacionado diretamente com a toxicidade do óleo. Os componentes mais leves (C1 ao C8), são considerados tóxicos, pois, são os mais biodisponíveis, 40% das frações mais leves da gasolina podem evaporar completamente dentro das primeiras 24 horas (API, 1999). Para Mackay e McAuliffe (1988), cerca de 50 a 70% da quantidade de óleo derramada é perdida por evaporação durante as primeiras 10 a 12 h após um vazamento. Segundo Brauner et al. (1999), os hidrocarbonetos de cadeias curtas são voláteis, permanecendo menos tempo nos ambientes aquáticos, no entanto são muitos mais tóxicos.

O modelo computacional descrito por Di Toro, McGrath e Stubblefield (2007) corrobora com o fato da toxicidade diminuir no processo de evaporação. Segundo os autores, a explicação da redução da toxicidade foi perceber que o intemperismo remove os componentes orgânicos mais tóxicos, persistindo os componentes orgânicos menos tóxicos. Ocorre uma perda da contribuição da toxicidade das frações mais leves do óleo, restando as frações intermediárias e mais pesadas (menos tóxicas).

À medida que o óleo sofre intemperismo, a fração mais leve é removida, restando apenas a fração mais pesada. Utilizando o modelo de lipídeos-alvos para descrever a toxicidade e a relação observada da solubilidade dos componentes do petróleo, demonstra-se que os componentes que possuem um coeficiente de partição octanol-água inferior ($\log K_{ow}$) têm maior potencial tóxico do que aqueles com altos valores de $\log K_{ow}$. O intemperismo remove os produtos químicos que possuem os menores valores de $\log K_{ow}$ que são aqueles com maior potencial tóxico, deixando aqueles com maiores valores de $\log K_{ow}$, ou seja, com menor toxicidade (DI TORO; MCGRATH; STUBBLEFIELD, 2007).

Em regra, os organismos tendem a acumular compostos com valores altos de $\log K_{ow}$, como exemplo dos HPA, nas porções lipídicas de seus tecidos. Estes são compostos apolares mais lipofílicos do que os BTEX que apresentam valores mais baixos de $\log K_{ow}$ (ATSDR, 1992).

2.8. Organismo-teste

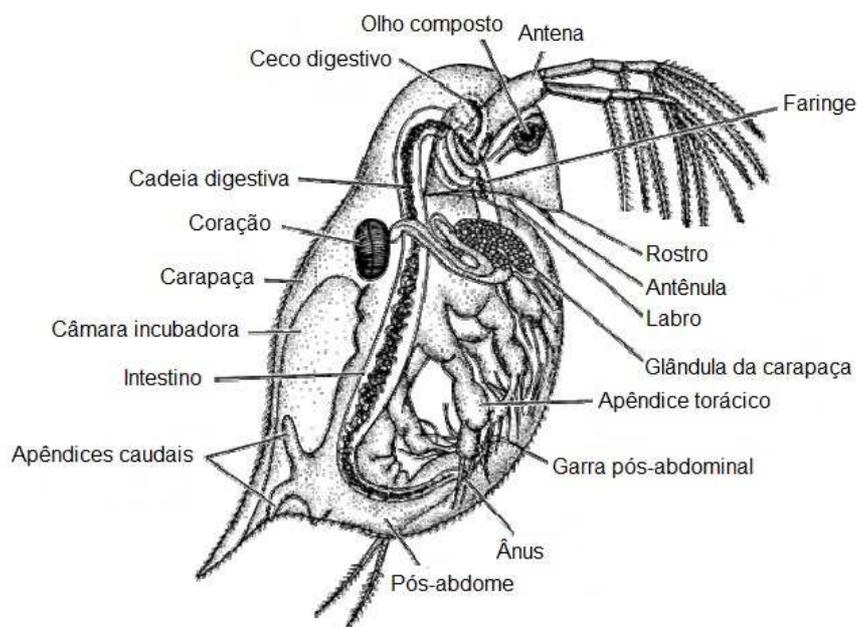
Para a realização dos ensaios ecotoxicológicos é necessário a seleção de organismos-teste. Estes são selecionados de acordo com alguns critérios, tais como sua abundância no ambiente, facilidade de cultivo no laboratório e conhecimento da biologia da espécie (RAND; WELLS; McCARTY, 1995).

Dentre as espécies que reúnem tais critérios, com metodologia de cultivo e de ensaio normalizada em vários países encontra-se o microcrustáceo de água doce *Daphnia similis*.

2.8.1. *Daphnia similis*

Cladóceros (Figura 7) de água doce, especialmente *Daphnia magna* e *Daphnia similis* representam as espécies mais comumente empregadas em bioensaios de água doce.

Figura 7 – Morfologia do cladócer, *Daphnia*.



Fonte: Adaptado de EBERT (2005).

O gênero *Daphnia* compreende microcrustáceos utilizados consideravelmente em ensaios agudos e crônicos para avaliar a toxicidade de agentes químicos e efluentes, devido à sua grande sensibilidade a um grande número de contaminantes aquáticos, sua importância na cadeia alimentar, sua facilidade em cultivo em laboratório e sua reprodução por partenogênese, o que permite a obtenção de organismos teste com constante sensibilidade (BURATINI; BERTOLETTI; ZAGATTO, 2004). As espécies de *Daphnia* possuem um tamanho variando de 0,5 a 5,0 mm de comprimento. As *Daphnias* são organismos filtradores, suas pernas torácicas, são compostas por cerdas que agem como peneiras retendo algas, bactérias e pequenas partículas de material orgânico. O alimento é levado para a boca, onde é moído pelas mandíbulas e direcionado para o trato digestivo (BUIKEMA; SHERBERGER, 1977).

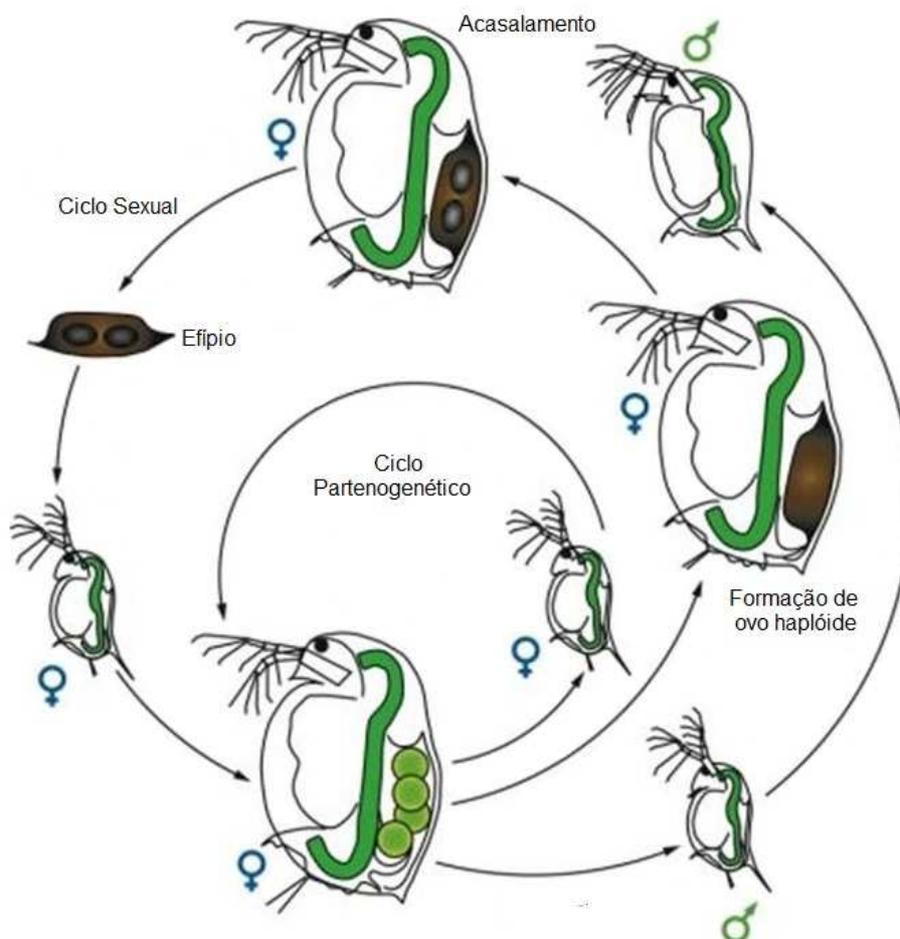
A Figura 8 mostra o ciclo de vida sexual e assexual (partenogenético) de uma *Daphnia similis*. Durante o ciclo partenogenético, as fêmeas produzem ovos diplóides que se desenvolvem diretamente em filhas. A mesma fêmea pode produzir ovos assexuados diplóides que se desenvolvem em filhos. A geração de machos

está sob influência do ambiente, como superpopulação, alteração na temperatura da água ou escassez de alimento. Além disso, a mesma fêmea pode produzir ovos haplóides que requerem fertilização por machos. Esta fecundação gera ovos rígidos e resistentes, possuindo uma coloração escura, chamados de efípio (Figura 9). Estes ovos, então, precisam passar por uma diapausa antes do nascimento de uma fêmea (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008; EBERT, 2005).

Os efípios flutuam, afundam ou aderem a objetos, podendo suportar o ressecamento e o congelamento até a passagem pelo intestino dos peixes, das aves e dos mamíferos que se alimentam de peixes. Por meio de tais ovos em repouso protegidos, os cladóceros podem dispersar-se pelo vento ou por meio de animais por alguma distância, podendo sobreviver ao inverno e às secas (RUPPERT; BARNES, 1996). Quando as condições ambientais do meio tornam-se favoráveis, os ovos de efípio eclodem, liberando fêmeas que irão reproduzir-se novamente por partenogênese (BARNES, 1984).

O seu ciclo de vida varia entre cerca de 40 dias a 25°C e 56 dias a 20°C. Quando mantida em laboratório, esta espécie entra na fase de maturação com 6 dias de vida e necessita de 6 a 10 dias para dar origem à primeira ninhada, tem, normalmente, neonatos de 2 em 2 dias. Os neonatos são liberados quando acontece a muda das carapaças (PEPPER; GERBA; BRUSSEAU, 1996).

Figura 8 - Ciclo de vida de *Daphnia similis*.



Fonte: Adaptado de EBERT (2005).

Figura 9 – *Daphnia* com efípio.



(a)



(b)

Legenda: (a) – fêmea adulta de *Daphnia similis* carregando um efípio em sua câmara incubadora; (b) – detalhe do ovo efípio (aumento de 10x).

Fonte: PRÓPRIA AUTORA (2013).

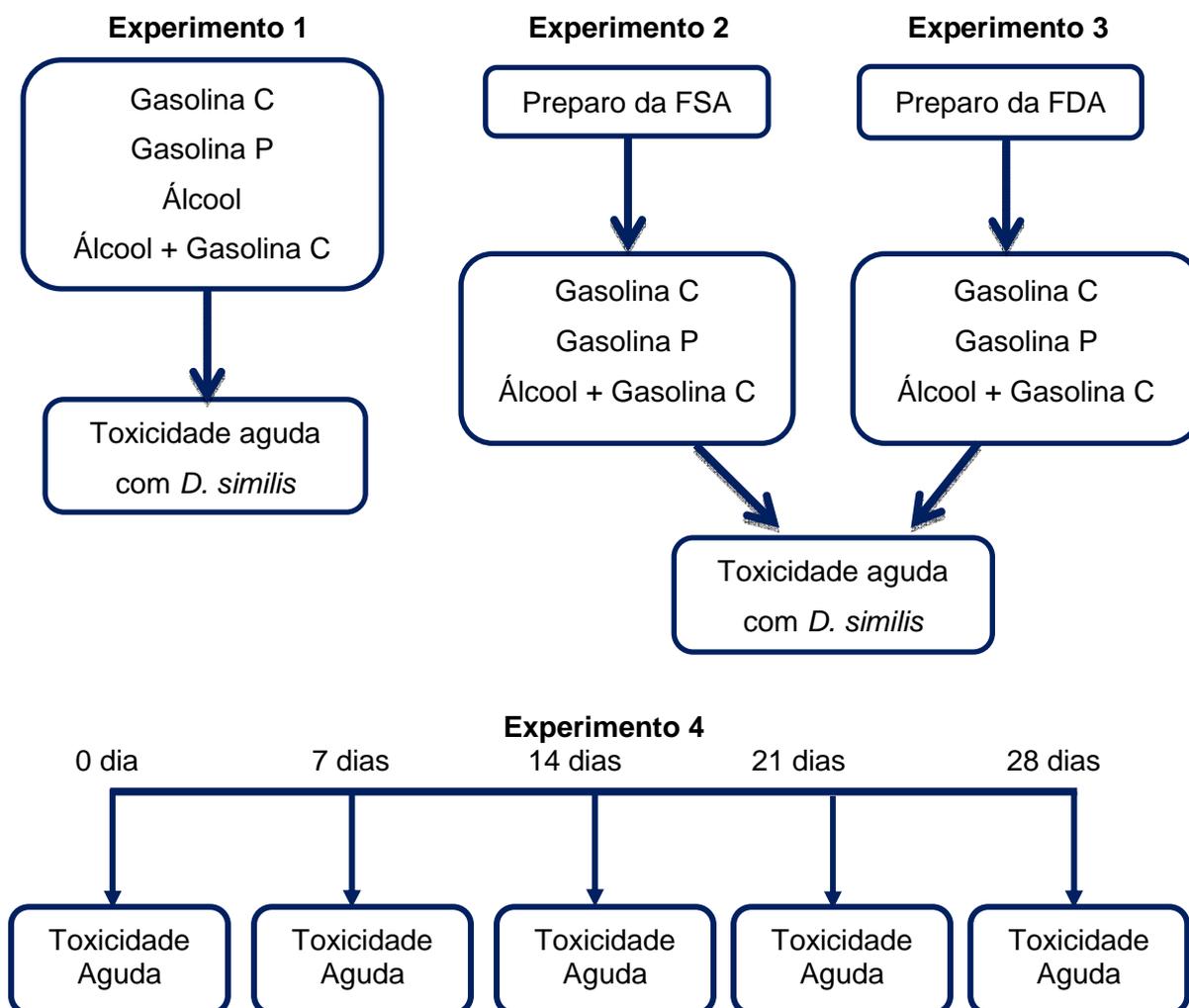
3. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biorremediação e Fitotecnologia (LABIFI) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) e foi executado de 2 etapas distintas (Etapa 1 e Etapa 2) abaixo descritas.

3.1. Materiais, planejamento e dimensionamento

ETAPA I: Contaminantes individuais, combinados e simulação de contaminação antiga em escala de bancada (vide Figura 10)

Figura 10 – Planejamento experimental dos ensaios de toxicidade aguda com *Daphnia similis*. Etapa I: Contaminantes individuais, combinados e simulação de contaminação antiga.



Na ETAPA 1, os Experimentos 1, 2, 3 da Figura 10 correspondem aos ensaios em escala de bancada, durante os quais, a espécie indicadora *D. similis* foi exposta a amostras de água contaminadas artificialmente com os contaminantes isolados ou em misturas, em diferentes concentrações e sob diferentes condições, com simulação de uma contaminação antiga pela Fração Solúvel em Água da Gasolina C (Experimento 4).

Combustíveis utilizados nos experimentos da ETAPA I:

Os combustíveis utilizados na ETAPA I, adquiridos em um posto de combustível comercial foram: Gasolina Comum (C), Gasolina Pura (P) e Álcool (A), cujas composições encontram-se na Tabela 6.

Tabela 6 - Propriedades físico-químicas: Gasolina Comum (C), Pura (P) e Álcool (A).

Características	Gasolina C	Gasolina P	Álcool A
Fórmula química	C ₈ H ₁₈	C ₈ H ₁₈	C ₂ H ₆ O
Solubilidade em água (mg/L)	100-200	100-200	Infinita
Massa molecular (g/mol)	78	78	46
Cor	Amarelado	Amarelado	Incolor
Solubilidade em solventes	Insolúvel	Insolúvel	Solúvel
Densidade (20°C) (g/cm ³)	0,72–0,74	0,8669	0,73
Ponto de ebulição Inicial (°C)	>35	>35	78,5
Coef. de part. octanol-água (20°C) (log K _{ow})	2,13	2,69	-0,31
Const. da lei de Henry (25°C) (kpa m ³ mol)		2,52 x 10 ⁻⁴	

Fonte: GOVERNORS' ETHANOL COALITION, (1999); API, (1993).

Efeitos resultantes da interação dos combustíveis em misturas:

O modelo utilizado neste estudo para avaliar a interação das substâncias foi proposto por Marking (1977) e utilizado por Zagatto (1995). Esse modelo expressa a

soma da aditividade de diferentes substâncias (S) e o índice de aditividade (IA), os quais são descritos a seguir:

$$S = \left(\frac{Am}{Ai} \right) + \left(\frac{Bm}{Bi} \right) \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

S = soma da aditividade

Am = concentração da substância A na mistura que causa 50% de efeito (CL50);

Bm = concentração da substância B na mistura que causa 50% de efeito (CL50);

Ai = concentração da substância A que, isolada, provoca 50% de efeito (CL50 da substância A);

Bi = concentração da substância B que, isolada, provoca 50% de efeito (CL50 da substância B).

Através do valor de S é possível determinar o efeito interativo das substâncias:

S > 1, o efeito é antagônico;

S = 1, o efeito é aditivo;

S < 1, o efeito é sinérgico.

Com base no valor de S calcula-se o Índice de aditividade (IA) na mistura:

S > 1 \longleftrightarrow IA = S (-1) + 1;

S < 1 \longleftrightarrow IA = 1/S - 1.

O IA irá indicar o quão maior ou menor a toxicidade conjunta da mistura é comparada com a soma das substâncias testadas individualmente.

3.2. Preparo das amostras

Existe uma quantidade infindável de metodologias para preparo de amostras a serem utilizadas em ensaios ecotoxicológicos. A gasolina por ser uma substância que possui baixa miscibilidade em água foi necessário realizar procedimentos específicos de extração com água, onde se utiliza equipamentos laboratoriais para o procedimento (Figura 11 e 12). A metodologia utilizada no preparo da Fração Solúvel em Água, Fração Dispersa em Água e do elutriato segue a descrita na NBR 15.469 (2007).

3.2.1. Preparo da Fração Solúvel em Água

Solução aquosa de uma amostra de baixa miscibilidade em água, obtida após o procedimento de extração com água.

Procedimento:

- Colocar em um recipiente de vidro, contendo um bastão magnético, uma parte de amostra para nove partes de água a ser utilizada no ensaio;
- Colocar o recipiente sobre um agitador magnético;
- Manter ao abrigo da luz e em agitação por 20 horas;
- Após o término da agitação, deixar em repouso por 1 h.
- Em seguida, drenar ou sinfonar somente a fase aquosa.

Figura 11 – Equipamento laboratorial utilizado no preparo da Fração Solúvel em Água (FSA) da Gasolina C.



Fonte: PRÓPRIA AUTORA, 2013.

3.2.2. Preparo da Fração Dispersa em Água

Solução aquosa de uma amostra de baixa miscibilidade em água, dispersa mecanicamente.

Procedimento:

- Colocar em um recipiente 1 mL da amostra para 999 mL de água de diluição;
- Agitar essa mistura em um homogeneizador por 5 segundos a uma velocidade de 12000 a 14000 rpm;.
- Utilizar o extrato para os ensaios.

Figura 12 – Equipamento laboratorial utilizado no preparo da Fração Dispersa em Água (FDA) da Gasolina C.



Fonte: PRÓPRIA AUTORA, 2013.

3.2.3. Preparo do Elutriato

Extrato conseguido com a lavagem do sedimento/solo em água através de um Jar Test (Figura 13).

Procedimento:

- Misturar uma parte de sedimento para quatro partes de água;
- Agitar essa mistura em um homogeneizador por 30 minutos com velocidade suficiente para ressuspender o material;
- Deixar sedimentar por 1 hora;
- Verter o sobrenadante para ser utilizado nos ensaios ecotoxicológicos.

Figura 13 – Equipamento laboratorial utilizado no preparo do elutriato.



Fonte: PRÓPRIA AUTORA, 2013.

Experimento 1: Ensaio com combustíveis totais isolados e em misturas

O estudo de toxicidade aguda com os combustíveis na sua forma original, consistiu de três ensaios, com cinco concentrações cada e quatro réplicas por concentração. Para todos os ensaios inicialmente eram testados 5 diluições (100; 50; 25; 12,5; e 6,25%) devido a toxicidade para alguns combustíveis os organismos morriam e era necessário, realizar um novo ensaio com 5 diluições (3,12; 1,56%, etc). Os ensaios paravam de ser realizados a partir do momento em que se observava a CE50%.

O grupo das cinco diluições onde a CE50% se encontra são apresentadas a seguir.

Gasolina C: 0,000312; 0,000625; 0,00125; e 0,005%, sendo que as três concentrações mais baixas foram preparadas a partir da concentração de 0,005%.

Gasolina P: 0,02; 0,04; 0,08; 0,16 e 0,32%.

Álcool: 0,16; 0,32; 0,64; 1,28 e 2,56%.

Com o objetivo de verificar a interação da mistura de dois combustíveis sobre *D. similis*, escolheu-se a Gasolina C que contém uma porcentagem de álcool variando de 20 a 25% e acrescentou-se álcool à mesma, aumentando-se assim, a proporção do álcool presente na mistura. Este experimento consistiu de três ensaios com cinco concentrações diferentes, cada concentração com quatro réplicas. A solução estoque foi preparada em uma balão volumétrico de 100 mL, onde foram adicionados 20% de Álcool e 80% de Gasolina C., a mistura passou a apresentar uma concentração final de álcool de 40 a 45% de álcool e 55 a 60% de gasolina. O grupo das cinco diluições onde o CE50% se encontra são apresentadas a seguir:

Gasolina C + Álcool: 0,0025; 0,005; 0,01; 0,02 e 0,04%.

Experimento 2: Ensaio com a fração solúvel em água-FSA e combustíveis isolados e em misturas

Este experimento consistiu em preparar a Fração Solúvel em Água (FSA) da Gasolina C e da Gasolina P, uma vez que estes dois combustíveis, diferentemente do Álcool, são imiscíveis em água. Este teste consistiu de três ensaios, com cinco concentrações, sendo cada concentração com quatro réplicas. O grupo das cinco diluições onde o CE50% se encontra são apresentadas a seguir.

FSA Gasolina C: 0,39; 0,78; 1,56; 3,12 e 6,25%.

FSA Gasolina P: 6,25; 12,5; 25; 50 e 100%.

Igualmente, com o objetivo de averiguar a toxicidade da FSA de misturas com concentrações crescentes de álcool em gasolina, realizou-se ensaios com a FSA das seguintes concentrações:

FSA Gasolina C + Álcool: 0,024; 0,049; 0,098; 0,195 e 0,39% de álcool.

Experimento 3: Ensaio com a fração dispersa em água – FDA de combustíveis isolados e em misturas

Este ensaio consistiu em preparar a Fração Dispersa em Água (FDA) da Gasolina C e da Gasolina P, uma vez que estes dois combustíveis, diferentemente do álcool, são imiscíveis em água. Este teste consistiu de três ensaios, com cinco concentrações, sendo cada concentração com quatro réplicas. O grupo das cinco diluições onde o CE50% se encontra são apresentadas a seguir.

FDA Gasolina C: 0,78; 1,56; 3,12 e 6,25 e 12,5%.

FDA Gasolina P: 0,78; 1,56; 3,12 e 6,25 e 12,5%.

Os efeitos da mistura foram acessados através dos ensaios abaixo:

FDA Gasolina C + Álcool: 1,56; 3,12; 6,25; 12,5 e 25%.

Experimento 4: Ensaio com simulação de contaminação antiga por gasolina

A metodologia de preparo da gasolina neste experimento seguiu o descrito no item 3.2.1. Objetivando obter um volume maior da amostra colocou-se 150 mL da Gasolina C com 1350 mL de água de diluição. Este experimento teve como finalidade verificar se houve a redução da toxicidade simulando condições de uma contaminação antiga. Para simular tais condições, a mistura de combustíveis ficou aberta e exposta no laboratório sob efeito da luz (10 h de luz/14 h de escuro), para permitir a evaporação dos compostos voláteis. A cada semana eram preparados dois ensaios com seis concentrações cada, sendo que para cada concentração eram montadas quatro réplicas. As seis concentrações onde se encontra a CE50% são apresentadas a seguir:

- FSA Gasolina C 0 dia: 0,39; 0,78; 1,56; 3,12; 6,25 e 12,5%.

- FSA Gasolina C 7º dia: 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50 e 100%.
- FSA Gasolina C 14º dia: 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50 e 100%.
- FSA Gasolina C 21º dia: 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50 e 100%.
- FSA Gasolina C 28º dia: 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50 e 100%.

ETAPA II: AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA EM ÁREA COM HISTÓRICO DE CONTAMINAÇÃO POR GASOLINA

Durante os ensaios da ETAPA II, a espécie indicadora *D. similis* foi exposta a diferentes amostras ambientais obtidas de uma área com histórico de contaminação por gasolina em decorrência de um derramamento ocorrido a após mais de um ano transcorrido antes das amostras terem sido obtidas (aged contamination). A finalidade dessa etapa foi avaliar os efeitos de uma contaminação antiga em escala real quanto à toxicidade da contaminação remanescente sobre *Daphnia similis*. Foi realizada uma única campanha de coleta de amostras ambientais e, portanto, os resultados referem-se a amostras obtidas nessa ocasião. Para o diagnóstico/varredura da área com contaminação antiga, foram coletadas 25 amostras, a saber:

- 2 amostras de água subterrânea (2 poços distintos) (P1 e P2);
- 8 amostras de água superficial de pontos amostrais em brejo (A1 ao A8);
- 8 amostras de sedimentos de pontos amostrais coincidentes com os 8 pontos amostrais de água superficial (S1 ao S8).

Para o ensaio com as 2 amostras de água subterrânea (P1 e P2) foram realizados ensaios com seis concentrações, cada concentração com quatro réplicas para cada amostra.

- P1 e P2: 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50 e 100%.

Para o ensaio com as 14 amostras de água superficial (A1 ao A8) foram realizados ensaios com cinco concentrações, cada concentração com quatro réplicas para cada amostra.

- A1 ao A8: 6,25; 12,5; 25; 50 e 100%.

Para o ensaio com as 8 amostras de sedimentos (S1 ao S8), foi preparado elutriato, conforme NBR 15.469 (2007). Foram realizados ensaios com cinco concentrações, cada concentração com quatro réplicas para cada amostra.

- S1 ao S8: 6,25; 12,5; 25; 50 e 100%.

3.3. Metodologia dos ensaios químicos das amostras em área com histórico de contaminação por gasolina

As análises químicas das amostras de água subterrânea, superficial e sedimentos da área contaminada por gasolina foram realizadas por laboratório comercial acreditado. A Tabela 7 apresenta as análises, os métodos aplicados e as matrizes aplicadas a esses métodos.

Tabela 7 – Parâmetros, metodologia e matrizes ambientais.

Parâmetro	Metodologia	Matrizes analisadas
BTEX	EPA 8021B:1996	Água subterrânea, superficial e sedimentos
TPH-GRO	EPA 8015C:2007	Água subterrânea, superficial e sedimentos
COT	EPA 415.3:2009	Água subterrânea, superficial e sedimentos
DQO	SMWWE 21 ^a ed. 5220D.	Água subterrânea, superficial e sedimentos

3.3.1. Procedimento com relação às amostras com valores abaixo dos limites de quantificação (Lq) dos métodos analíticos aplicados

Em uma abordagem conservadora (voltada à proteção ambiental) e, tendo em vista o fato de que vários Limites de Quantificação (LQ) definidos pelo laboratório podem ser considerados relativamente altos, optou-se por definir como valor mais provável, a metade do LQ informado. Tal procedimento tem sido adotado por vários trabalhos científicos e em programas de monitoramento de qualidade de água em diferentes países, em consonância com as bases estatísticas de monitoramento ambiental e análise de séries históricas (GILBERT, 1987). Na tabela, tais valores estão em *itálico*.

Concentrações acima dos valores orientadores: Nas amostras em que o observado estava acima do limite utilizado como referência, tal valor é apresentado **negrito**.

3.4. Cultivo e manutenção do organismo-teste

3.4.1. Cultivo de *D. similis*

Os organismos iniciais foram obtidos em 2012 das culturas de *Daphnia similis* do Laboratório de Análises Ambientais (LABTOX) e o cultivo de *D. similis* no LABIFI foi estabelecido a partir de então. A metodologia de cultivo do organismo-teste *Daphnia similis* Claus, 1876 (Cladocera, Crustacea) seguiu o descrito na NBR 12.713 (2009).

Os organismos eram mantidos em béquer de vidro de 2.000 mL em lotes contendo 50 organismos, fotoperíodo ajustado para 16 h de luz/8 horas de escuro, intensidade luminosa em torno de 1000 lux e temperatura regulada para 20°C (\pm 1°C). Tais condições foram obtidas com a utilização de uma incubadora de DBO modificada (Figura 14).

Figura 14 – Cultivo de *Daphnia similis* em incubadora no LABIFI.



Fonte: PRÓPRIA AUTORA, 2013.

As *Daphnias* foram cultivadas em água reconstituída, com pH variando de 7,0 a 7,8 e a dureza ajustada para 40 a 48 mg.L⁻¹ CaCO₃ (NBR 12.713). A água de cultivo e de diluição foi preparada a partir das soluções da Tabela 8.

Para o preparo da água de cultivo e de diluição eram adicionados 20 mL da solução 1 e 10 mL da solução 2 em 970 mL de água processada. Depois de preparada, a água era aerada por 12 a 24 h, tempo suficiente para que o pH se estabilize, o oxigênio dissolvido atinja a saturação e para a solubilização total dos sais.

O meio de cultivo era renovado duas vezes por semana, sendo uma troca parcial (na 3^a feira) e uma completa (na 6^a feira). Semanalmente eram descartados os lotes com quatro semanas e iniciados lotes novos.

Tabela 8 – Soluções para preparo da água de cultivo e de diluição para *D.similis*.

Solução	Reagente	Quant.(mg)	Preparo
1	CaSO ₄ .2H ₂ O	1500	Dissolver e diluir para 1000 mL de água destilada
	KCl	200	
2	NaHCO ₃	4800	Dissolver e diluir para 1000 mL de água destilada
	MgSO ₄ .7H ₂ O	6100	

Fonte: NBR 12.713 (2009).

3.4.2. Alimentação de *D. similis*

Como alimento é fornecido diariamente para *Daphnia similis*, a alga clorofícea *Pseudokirchneriella subcapitata*, na concentração de 1 x 10⁶ células por organismos. A alga é cultivada em meio JM (Meio de Jaworski), sob aeração e iluminação constantes, à intensidade luminosa de 2800 lux e a temperatura média de 24°C (com variação máxima de 2°C).

Além da alga, os organismos foram alimentados com um complemento alimentar a base de ração de peixe. Para seu preparo, pesa-se 10 g de ração de peixe em 1000 mL de água destilada, essa mistura fica sob aeração durante 1 h, deixa-se decantar por 1 h e filtra-se essa mistura em rede de zooplâncton.

3.4.3. Cultivo de algas para alimentação de *D. similis*

A Tabela 9 apresenta os reagentes utilizados para o preparo do meio de cultivo para a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. Para o preparo do alimento, as culturas foram centrifugadas a 10.000 rpm, durante 15 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o resíduo ressuspensionado com água reconstituída. A concentração desejada de algas (10^6 células por organismos) foi obtida através da contagem das células no microscópio em câmara de Neubauer.

Tabela 9 – Composição do meio JM para cultivo de *Pseudokirchneriella subcapitata*.

Soluções	Reagentes	Quant. de reagente para solução estoque (g/100mL)	Vol. retirado da estoque para cada litro de meio
1	Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	2,0	1,0 mL
2	KH ₂ PO ₄	1,22	1,0 mL
3	MgSO ₄ .7H ₂ O	5,0	1,0 mL
4	NaHCO ₃	1,59	1,0 mL
5	EDTA Na ₂	0,225	1,0 mL
	EDTA FeNa	0,205	
6	MnCl ₂ .4H ₂ O	0,137	1,0 mL
	H ₃ BO ₃	0,247	
	(NH ₄)Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0,099	
7	Tiamina (B1)	0,004	1,0 mL
	Biotina (H)	0,004	
	Cianocobalamina	0,004	
8	NaNO ₃	7,92	1,0 mL
9	Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	3,56	1,0 mL

Fonte: Adaptado de THOMPSON; RHODES; PETTMAN (1988).

3.5. Ensaio ecotoxicológicos

3.5.1. Ensaio de toxicidade aguda com *D. similis*

O ensaio foi realizado segundo a ABNT NBR 12.713 (2009). Para a obtenção de organismos com a idade adequada (6 a 24 h), no dia anterior ao teste é realizada uma limpeza total dos béqueres retirando-se todos os filhotes. Na manhã seguinte, os indivíduos neonatos foram separados dos adultos e mantidos em meio de cultivo por 6 h, até o início do teste.

Os organismos neonatos foram expostos às diferentes concentrações da amostra, e os ensaios foram compostos por quatro réplicas de cada concentração (tratamento) e um tratamento controle (somente água reconstituída). As diluições foram preparadas com precisão volumétrica, em progressão geométrica de razão 2. Os ensaios foram realizados em béqueres de vidro com 25 mL de capacidade. No ensaio com misturas seguiu-se o mesmo procedimento. A Figura 15 mostra a bancada laboratorial utilizada para a montagem dos ensaios com *Daphnia similis*.

Figura 15 - Preparo das soluções-teste para o ensaio de toxicidade aguda com *Daphnia similis*.



A Figura 16 ilustra uma etapa do ensaio de toxicidade com *Daphnia similis*. Os ensaios foram mantidos em incubadora, no escuro com temperatura ajustada para $20 \pm 1^\circ\text{C}$ e sem alimentação. Depois de 24 h de exposição, era realizada uma verificação dos béqueres e os organismos imóveis e/ou mortos eram retirados do béquer, com anotação em planilha. Após esse o tempo do ensaio (48 h), o número de organismos imóveis (ou mortos) por concentração era registrado e a partir destes dados, calculava-se a porcentagem de imobilidade por concentração. O resultado do teste é expresso em Concentração Efetiva Inicial Mediana - CE(I)50 48h, que corresponde à concentração da amostra no início do ensaio, que causa efeito agudo a 50% dos organismos expostos após 48 h, nas condições estabelecidas. Para validação do ensaio a mortalidade/imobilidade do grupo controle não deveria exceder 20%.

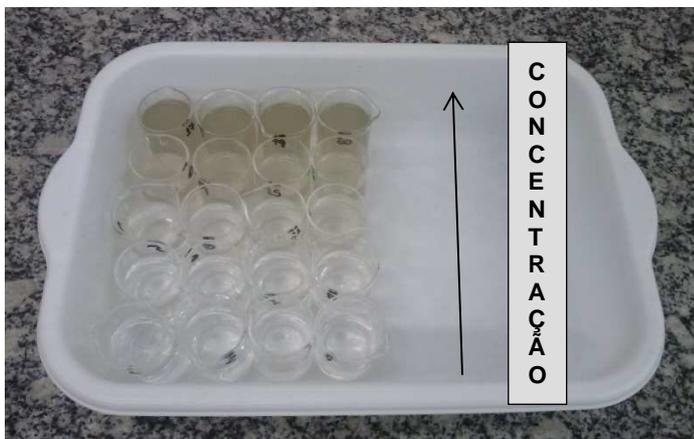
Figura 16 – Ilustração da série de diluições para ensaio de toxicidade aguda.



Fonte: PRÓPRIA AUTORA, 2013.

A Figura 17 mostra a estrutura básica para realização de um ensaio de toxicidade aguda onde é possível observar a mudança gradual da cor da amostra indicando que quanto mais forte a coloração, mais concentrada é a amostra.

Figura 17 – Ensaio de toxicidade aguda com *D. similis* com amostra mostrando gradiente de coloração.



Fonte: PRÓPRIA AUTORA (2013).

3.5.2. Ensaio de Sensibilidade para controle de qualidade do cultivo

Os ensaios ecotoxicológicos apresentam variabilidade dos resultados, assim bem como outros métodos de análise. A variabilidade pode ser atribuída a diversos fatores, tais como: habilidade dos técnicos na execução do ensaio, variações das condições do laboratório (temperatura, luz, oxigênio dissolvido, qualidade da água).

O controle de sensibilidade dos organismos, através da realização periódica de ensaios com determinadas substâncias de referência é um procedimento que permite maior precisão e confiabilidade nos resultados obtidos pelo laboratório.

Inicialmente, foram realizados testes de sensibilidade com substância de referência o Cloreto de Sódio (NaCl) para avaliar a sanidade dos organismos-testes. Os organismos-testes utilizados tinham idade de 6 a 24 h, de acordo com a NBR 12.713 (2009).

3.5.3. Classificação das amostras quanto ao seu potencial tóxico

A partir dos resultados das determinações da CE(I)50 48h foi utilizada uma escala de toxicidade relativa, conforme mostra a Tabela 10 de acordo com CETESB (1987):

Tabela 10 - Escala de toxicidade relativa - CE50 48h (%) para *Daphnia similis*.

Valores de CE(I)50	Toxicidade relativa
< 25%	Muito Tóxica
25% - 50%	Tóxica
51% - 75%	Moderadamente Tóxica
> 75%	Levemente Tóxica
100%	Não tóxica

3.5.4. Análises Estatísticas dos dados obtidos com os ensaios de toxicidade

Para os ensaios de toxicidade aguda com *D. similis* foi efetuado o cálculo da concentração que causou a imobilidade de 50% dos organismos testados (CE50) por meio do método *Trimmed Spearman-Kärber* (HAMILTON; RUSSO; THURSTON, 1977).

Para a comparação das médias obtidas para amostras diferentes, foi utilizado o teste paramétrico one-way ANOVA seguido do teste de comparação de Tukey, adotando-se um nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Etapa I: Contaminantes individuais, combinados e simulação de contaminação antiga

4.1.1. Ensaio com contaminantes individuais

A Tabela 11 apresenta uma comparação entre os resultados dos três ensaios ecotoxicológicos obtidos com a Gasolina C completa e suas frações FSA e FDA. Os resultados estão expressos em CE50 48 h (%).

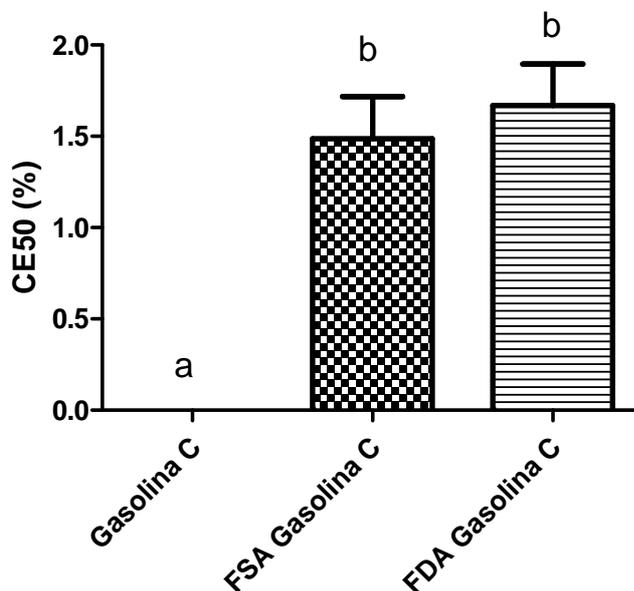
Tabela 11 - Valores de CE50 48 h (%) obtidos nos ensaios de toxicidade aguda com Gasolina C e suas frações sobre *D. similis*.

Ensaio	Gasolina C	FSA Gasolina C	FDA Gasolina C
1	0,00129	1,46	1,86
2	0,00085	1,73	1,42
3	0,00125	1,27	1,73
Média ± d.p.	$1,13 \times 10^{-3} \pm 0,2433 \times 10^{-3}$	$1,487 \pm 0,231$	$1,670 \pm 0,226$

Para realização da análise estatística o controle não foi considerado, uma vez que não houve mortalidade no controle superior a 50% e, desta forma, a CE50 (%) não pode ser calculada. Comparou-se a toxicidade obtida através dos ensaios com Gasolina C e suas frações.

A Gasolina C pura colocada diretamente na água de diluição apresentou uma CE50 (%) de $1,13 \times 10^{-3} \pm 0,2433 \times 10^{-3}$ que corresponde a uma toxicidade 1.315 vezes superior à obtida com FSA e 1.477 vezes superior à obtida com FDA. As diferenças entre os resultados obtidos com a Gasolina C e aquela obtida com suas frações FSA e FDA foram significativas ($p < 0,05$), enquanto que os ensaios FSA e FDA não apresentaram diferença significativa entre si ($p < 0,05$) (Figura 18).

Figura 18 - Médias e desvios-padrão (d.p.) relativos à série de três ensaios da Gasolina C e suas frações.



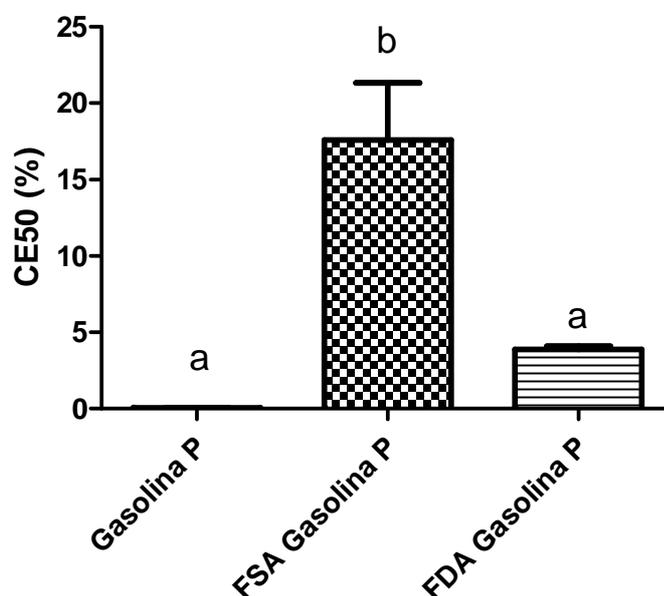
A Tabela 12 mostra os resultados expressos em CE50 48 h (%) das 3 metodologias de preparo utilizadas com a Gasolina P. Assim como o ocorrido nos ensaios com Gasolina C, para a análise estatística o controle não foi considerado, uma vez que não houve mortalidade no controle superior a 50%, desta forma, a CE50 (%) não foi calculada.

Comparou-se os resultados dos ensaios com a Gasolina P e suas frações. A Gasolina P colocada diretamente na água de diluição apresentou uma CE50 (%) média de 0,058, que corresponde a uma toxicidade 303 vezes superior à FSA e 67 vezes superior à FDA. Os resultados obtidos com FSA foram significativamente diferentes dos obtidos com Gasolina P e da FDA ($p < 0,05$), sendo que os resultados obtidos com os ensaios com Gasolina P e FDA não apresentaram diferenças significativas entre si ($p < 0,05$) (Figura 19).

Tabela 12 - Valores de CE50 48 h (%) obtidos nos ensaios de toxicidade aguda com Gasolina P e suas frações sobre *D. similis*.

Ensaio	Gasolina P	FSA Gasolina P	FDA Gasolina P
1	0,05	21,76	3,84
2	0,075	14,55	3,71
3	0,051	16,49	4,12
Média \pm d.p.	0,058 \pm 0,01415	17,60 \pm 3,731	3,89 \pm 0,2095

Figura 19 – Médias e desvios-padrão (d.p.) relativos à série de três ensaios da Gasolina P e suas frações.



Comparando as Tabelas 11 e 12 pode-se constatar que tanto a Gasolina C quanto a Gasolina P foram altamente tóxicas para os organismos. A FSA da Gasolina P apresentou menor toxicidade quando comparada com a FSA da Gasolina C, por ser um método que envolve a extração dos compostos para a água por 20 horas, a presença do álcool na Gasolina C facilitou um carregamento de maiores quantidades de substâncias da gasolina para água, conferindo maior toxicidade.

De acordo com Corseuil e Alvarez (1996), a solubilidade dos hidrocarbonetos monoaromáticos (BTEX) encontrados na gasolina poderá ainda ser maior se a gasolina for misturada com solventes orgânicos oxigenados, tais como álcool e éteres, como é o caso da gasolina comercial brasileira que é misturada com etanol, que é um cossolvente potencial. Portanto, uma alta concentração de etanol na água pode facilitar a transferência dos BTEX presentes na gasolina para a fase aquosa, aumentando a solubilidade dos hidrocarbonetos aromáticos na água subterrânea, num processo chamado de “efeito de cossolvência” (BANERJEE; YALKOWSKY, 1988; CORSEUIL; MARINS, 1997). Pode-se concluir que a contaminação de aquíferos e solos por misturas de álcool e gasolina será mais complexa e mais difícil de ser remediada do que a causada somente pela gasolina pura.

Segundo Miller (2001), existe uma relação entre a solubilidade e a mobilidade, ou seja, quanto mais solúvel um composto, maior a sua mobilidade. Já no caso da viscosidade, a sua redução aumenta a mobilidade. Esta relação reflete o poder de extensão da pluma de contaminação, principalmente no que diz respeito à gasolina acrescida de álcool, pois o álcool aumenta a solubilidade da gasolina e reduz a viscosidade desta.

Invertebrados de água doce formam um grupo extenso que apresenta grande diversidade, com sensibilidades ao petróleo que podem variar substancialmente. Em geral, eles tendem a ser um pouco mais sensível do que as algas e tão ou menos sensível quanto algumas espécies de peixes (MILLEMANN et al., 1984).

Investigações laboratoriais mostraram a presença de alguns efeitos subletais (deficiência de crescimento e reprodução) nos invertebrados de água doce expostos em concentrações relativamente baixas de Fração Solúvel em Água-FSA de derivados do petróleo (GEIGER E BUIKEMA, 1982; RATUSHNYAK et al., 2009).

A maioria das pesquisas ecotoxicológicas relacionadas ao petróleo bruto tem incidido sobre a sua fração solúvel em água (FSA), porque esta é a porção que entra no ambiente aquático com maior facilidade e que pode infligir danos agudos imediatos sobre os organismos aquáticos (MARTÍNEZ-JERÓNIMO et al., 2005). Segundo Winter et al. (1976), a fração solúvel de petróleo bruto pode deprimir o fitoplâncton, interferindo na fotossíntese, na respiração e no crescimento, e também pode inibir o crescimento das raízes de plantas aquáticas.

Zioli (1999) afirma que a fração solúvel em água (FSA) do petróleo é a principal responsável pelo impacto ambiental causado por derivados de petróleo, tanto por ser visualmente imperceptível quanto pelas transformações químicas de seus constituintes iniciais.

Martínez-Jerónimo et al. (2005), compararam experimentalmente os danos da FSA de sete tipos de óleo cru provenientes do México com fragmentos de argila cru adsorvidas ao óleo cru. Os autores concluíram que a argila adsorvida com o óleo foi mais tóxica do que a FSA nos ensaios de toxicidade aguda com *Daphnia magna*.

Müller (2011) realizou ensaios de toxicidade aguda com o microcrustáceo aquático *D. magna* e encontrou uma CE50-48 h, de 39,56% para a FSA do diesel, 43,42% para a FSA do B5 (mistura binária diesel/biodiesel de 5%) e 94,43% para a FSA do biodiesel. Estes resultados mostram que a FSA do biodiesel estudado foi considerada pouco tóxica para a *Daphnia magna*, enquanto a FSA do diesel e do B5

(este, provavelmente em decorrência da presença do componente diesel) foram consideradas tóxicas.

Pont (2012) conduziu experimentos com o objetivo de avaliar, em laboratório, as respostas toxicológicas relacionadas à mortalidade e a histologia branquial do peixe da espécie *Astyanax altiparanae*, para isso, utilizou o óleo diesel (bruto) e a FSA do óleo diesel. O autor observou que a concentração de óleo diesel necessária para causar efeito letal para 50% dos peixes em 24 h era 25 vezes menor que a concentração da FSA, evidenciando sua maior toxicidade no início da exposição. Com o passar do tempo, para ambas as substâncias testadas, os efeitos tóxicos aumentaram e a CL50 diminuiu, alcançando valores de 1,35% para o óleo diesel, e de 25,21% para a FSA do óleo diesel. Apesar do combustível estudado e o organismo-teste utilizados serem diferentes, é possível traçar um paralelo entre tais resultados com os encontrados no presente trabalho. A gasolina apresentou uma CE50 de 0,058% e a FSA da gasolina apresentou uma CE50 de 17,60%. Nesses dois trabalhos, é possível verificar que a toxicidade do combustível puro é substancialmente superior quando comparado com suas Frações Solúveis em Água.

Rodrigues et al. (2010) estudou os efeitos deletérios da FSA do petróleo brasileiro, FSA do diesel automotivo e FSA da gasolina sem chumbo para as larvas marinhas do peixe *Odontesthes argentinensis*, empregando ensaios de toxicidade e exames histopatológicos. Cada FSA foi gerada misturando quatro partes de água do mar com uma parte do poluente por aproximadamente 22 h. As larvas foram expostas durante 96 h a diferentes concentrações de FSA de petróleo, diesel e gasolina, além de um controle. Após 96 h de exposição, foram amostrados três grupos de larvas para estudos histopatológicos. A concentração letal média após 96 h (CL50) de exposição para a FSA do petróleo foi igual a 70,68%, valor significativamente superior ($p < 0.05$) aos valores de CL50 96h obtidos para o FSA do óleo diesel e da gasolina, que foram 13,46% e 5,48% respectivamente. O exame histológico de larvas de peixe-rei expostas às FSA do petróleo, diesel e gasolina após 96 h revelou uma variedade de lesões nas larvas. Pode-se observar neste trabalho que as Frações Solúveis em Água da Gasolina podem ser bastante tóxicas para os organismos aquáticos.

O éter metil-terciário butílico (MTBE), composto químico com fórmula molecular $C_5H_{12}O$ é um líquido volátil, inflamável, incolor e miscível em água, que foi muito utilizado como aditivo de gasolina para elevar a octanagem, embora seu uso

tenha declinado nos EUA devido às implicações ambientais e sobre a saúde humana. Ranjbar et al. (2011), estudando realizou bioensaios com *Daphnia magna*, utilizando a FSA do MTBE. Com esses ensaios, atingiu um CE50 em 24h e 48h de 646 e 476 mg/L respectivamente, indicando que *D. magna* pode ser utilizada para ensaios em águas superficiais e subterrânea, devido à sua resistência contra poluição por MTBE.

4.1.2. Ensaio da simulação de contaminação antiga por gasolina

A Tabela 13 apresenta os valores de CE50 48 h (%) referentes aos ensaios da FSA da Gasolina C exposta no laboratório por 28 dias (Experimento 4), onde a cada 7 dias, uma alíquota era retirada para a realização do ensaio.

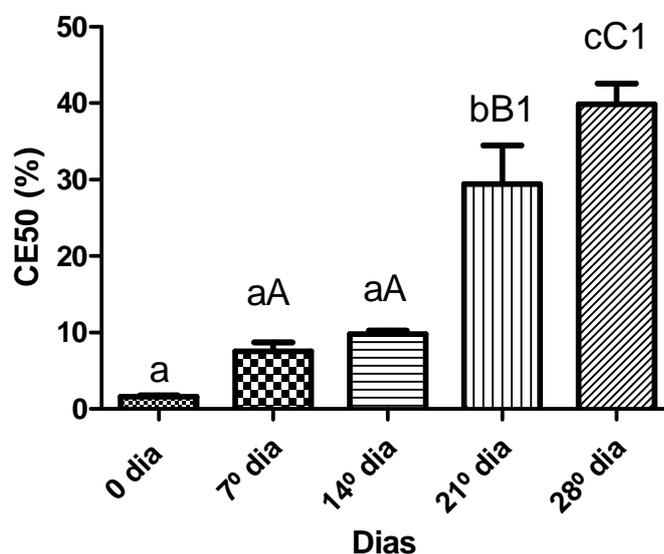
Tabela 13 – Valores de CE50 48 h (%) obtidos nos ensaios de toxicidade aguda da simulação de contaminação antiga por gasolina sobre *D. similis*.

Tempo de exposição da amostra	Ensaio 1	Ensaio 2	Média
0 dia	1,46	1,73	1,59
7 dias	8,37	6,67	7,52
14 dias	9,47	10,15	9,81
21 dias	32,99	25,88	29,44
28 dias	37,89	41,80	39,85

Para a análise estatística, o controle não foi considerado, uma vez que não houve mortalidade no controle superior a 50% e, desta forma, a CE50 (%) não foi calculada. Os valores CE50 (%) aumentaram com o passar do tempo do dia 0 ao 28º dia (Figura 20), o que significa redução crescente de toxicidade, sendo que a CE50 obtidos nos dias 0, 7º e 14º dias não apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$), mas foram significativamente diferentes da CE50 obtida nos ensaios do 21º e 28º dias ($p < 0,05$). O ensaio realizado no 21º não apresenta diferença significativa para o ensaio realizado no 28º dia ($p < 0,05$).

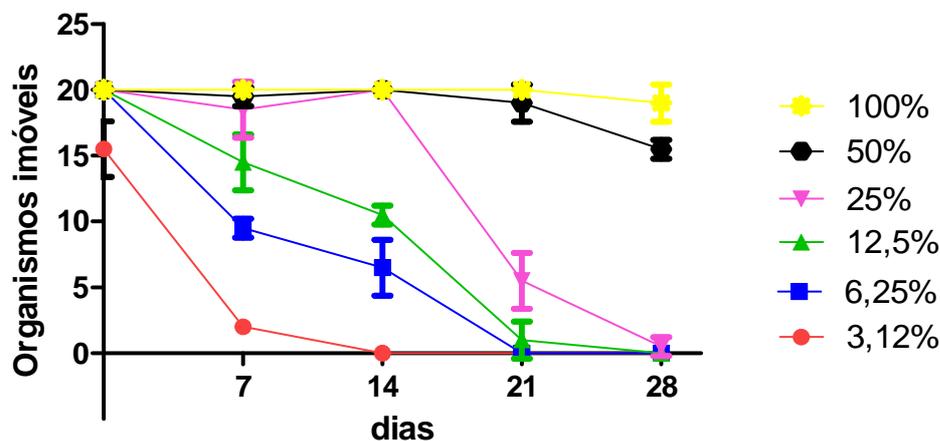
Do início ao 28º dia do ensaio, houve uma diminuição da toxicidade em cerca de 25 vezes. Tal diminuição deve ser devido principalmente, à volatilização dos compostos BTEX.

Figura 20 - Médias e desvios-padrão (d.p.) relativos à série de dois ensaios da simulação de contaminação antiga por gasolina.



Na Figura 21, observa-se que embora no dia 0, todas as concentrações tiveram alto índice de organismos imóveis, quando os organismos eram expostos após a simulação do derramamento, houve um claro decaimento do número de organismos imóveis quando os mesmos eram expostos após transcorridos de 7 a 28 dias (período máximo de exposição medida). A medida que o tempo vai transcorrendo, a taxa de imobilidade dos organismos vai caindo de forma acentuada, exceto para as concentrações de 100% e 50%.

Figura 21 – Média e desvio-padrão do número de organismos imóveis dentre os animais expostos à amostra contaminada com diferentes idades (0,7,14, 21 e 28 dias de contaminação antiga).



Bhattacharyya, Klerks e Nyman (2003) investigaram os efeitos da toxicidade do óleo cru e diesel tratados com dispersante utilizando *Daphnia pulex*, *Chironomus tentans* e *Oryzias latipes*. Os bioensaios com *Daphnia* foram realizados em microcosmos transcorridos 1, 7, 31 e 186 dias após o tratamento com dispersante. Os autores comprovaram que a sobrevivência das *Daphnia pulex* aumentou com o passar do tempo de ocorrido do derramamento e a toxicidade foi drasticamente reduzida, conforme observado no presente estudo após 28 dias de exposição.

4.1.3. Ensaio com mistura binária de combustíveis

Os valores das concentrações de Álcool, Gasolina C, FSA Gasolina C e FDA Gasolina C presentes nas soluções individuais e na mistura binária, correspondentes à concentração que causa efeito a 50% dos organismos testados (CE50) e o cálculo da Soma da Aditividade decorrente da mistura obtida nos três experimentos são apresentados na Tabela 14, 15 e 16.

Tabela 14 - Toxicidade aguda para *D. similis* e aditividade decorrente da mistura Álcool e Gasolina C.

Série de ensaios	Combustíveis estudados	CE50; 48 h (%)		Soma da aditividade	Índice de aditividade S (-1) + 1
		CE50 (%) do combustível individualmente	Conc. do combustível na mistura*		
1	Álcool	0,31	0,0008	2,48	- 1,48
	Gasolina C	0,00129	0,0032		
2	Álcool	0,29	0,001	4,70	- 3,70
	Gasolina C	0,00085	0,004		
3	Álcool	0,24	0,0007	2,24	- 1,24
	Gasolina C	0,00125	0,0028		
Índice de aditividade (valor médio dos três ensaios)					- 2,14

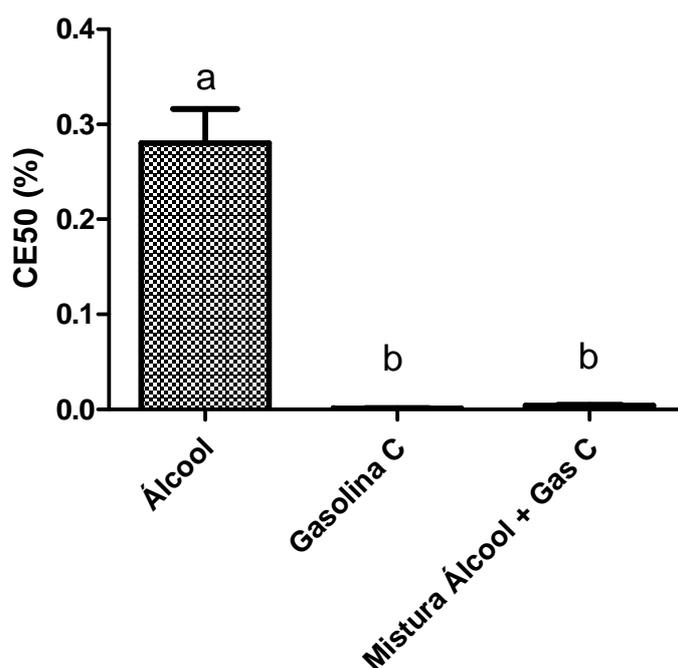
*que causa 50% do efeito

Os valores de S calculados (soma das ações tóxicas) foram, no caso da mistura Álcool + Gasolina C, superiores a 1. Conclui-se, portanto, que nas três séries de ensaio o efeito é abaixo do esperado se houvesse efeito aditivo (antagonismo).

O índice de aditividade (IA) calculado sobre os dados obtidos da mistura Álcool + Gasolina C significa que a toxicidade conjunta da mistura é 2,14 menor que a soma da toxicidade dos combustíveis testados isoladamente.

Para esta análise estatística o controle não foi considerado, pelo mesmo motivo informado nas análises anteriores. O tratamento que apresentou menor CE50 (%) foi da Gasolina C, porém, a diferença não é significativa quando comparado com os ensaios da mistura álcool + gasolina C com álcool ($p < 0,05$). Estes dois ensaios apresentaram diferença significativa comparado aos ensaios com álcool ($p < 0,05$) (Figura 22).

Figura 22 - Médias e desvios-padrão (d.p.) relativos à série de três ensaios dos combustíveis Álcool e Gasolina C individuais e em mistura.



Na Figura 23 observa-se que o combustível Álcool apresentou valores superiores (menos tóxico) de CE50 em comparação com a Gasolina C e a mistura.

Figura 23 – Valores de CE50 48 h (%) com os limites de confiança superiores e inferiores relativos aos três ensaios com Álcool, Gasolina C e da mistura binária Álcool + Gasolina C

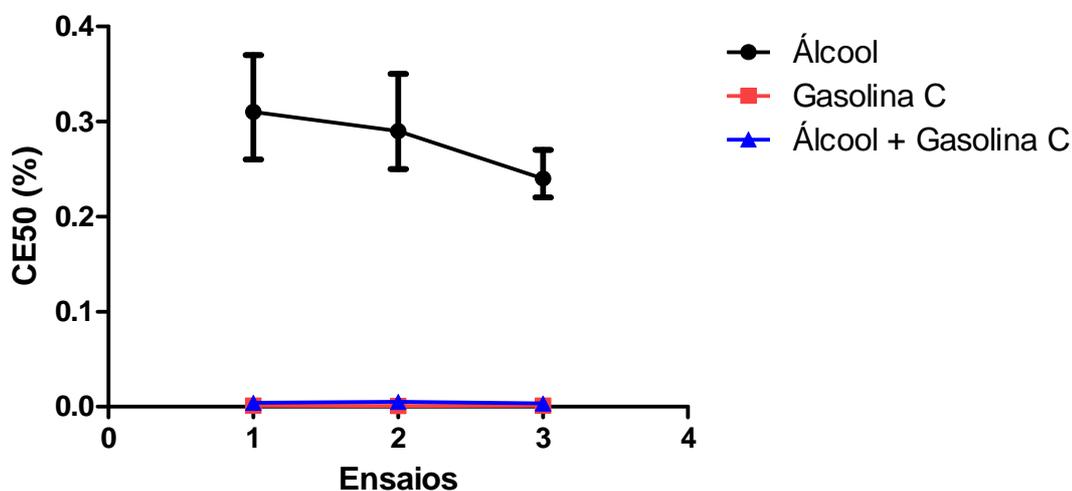


Tabela 15 - Toxicidade aguda para *D. similis* e aditividade decorrente da mistura Álcool e FSA da Gasolina C.

Série de ensaios	Combustíveis estudados	CE50; 48 h (%)		Soma da aditividade	Índice de aditividade S(-1) + 1
		CE50 (%) do combustível individualmente	Conc. do combustível na mistura*		
1	Álcool	0,31	0,602	3,59	-2,59
	FSA Gas. C	1,46	2,408		
2	Álcool	0,29	0,692	3,99	-2,99
	FSA Gas. C	1,73	2,768		
3	Álcool	0,24	0,524	3,83	-2,83
	FSA Gas. C	1,27	2,096		
Índice de aditividade (valor médio dos três ensaios)					-2,80

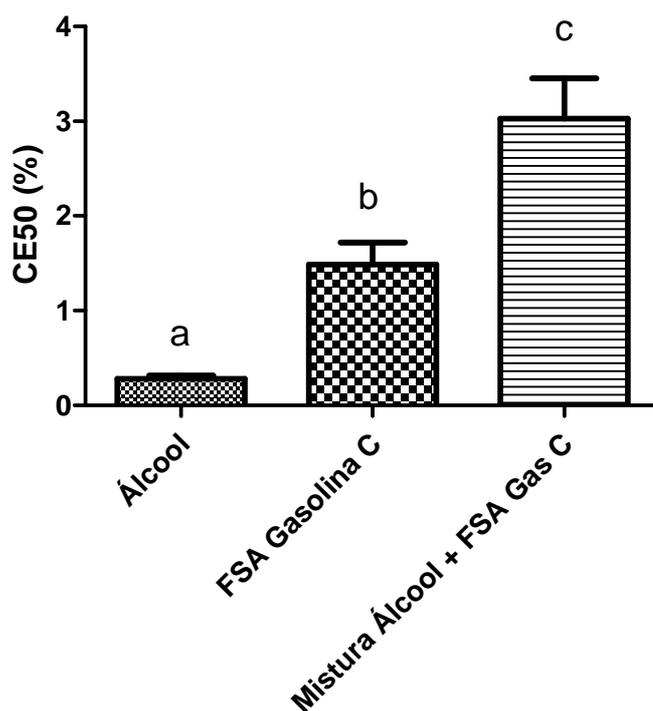
*Concentração que causa efeito em 50% dos organismos.

Os valores de S (soma das ações tóxicas) calculados foram no caso da mistura Álcool + FSA da Gasolina C, superiores a 1. Concluiu-se, portanto, que nas três séries de ensaio o efeito é menos que aditivo (antagonismo).

O índice de aditividade (IA) calculado sobre os dados obtidos da mistura Álcool + FSA da Gasolina C significa que a toxicidade conjunta da mistura é 2,8 vezes menor que a soma da toxicidade dos combustíveis testados isoladamente.

Para esta análise estatística o controle não foi considerado, uma vez que não houve mortalidade no controle superior a 50%, desta forma, a CE50 (%) não foi calculada. O tratamento que apresentou menor CE50 (%) foi o ensaio com álcool, o que indica maior toxicidade. Os três ensaios apresentaram diferenças significativas entre si ($p < 0,05$) (Figura 24).

Figura 24 - Médias e desvios-padrão (d.p.) relativos à série de três ensaios com os combustíveis Álcool e FSA da Gasolina C individualmente e em misturas.



Na Figura 25, observa-se que a mistura Álcool + FSA Gasolina C apresentou os maiores valores de CE50% (menos toxicidade) em comparação com a FSA da Gasolina C e o Álcool separadamente.

Figura 25 – Valores de CE50 48 h(%) com os limites de confiança superiores e inferiores relativos aos três ensaios com Álcool, FSA da Gasolina C e da mistura binária Álcool + FSA da Gasolina C.

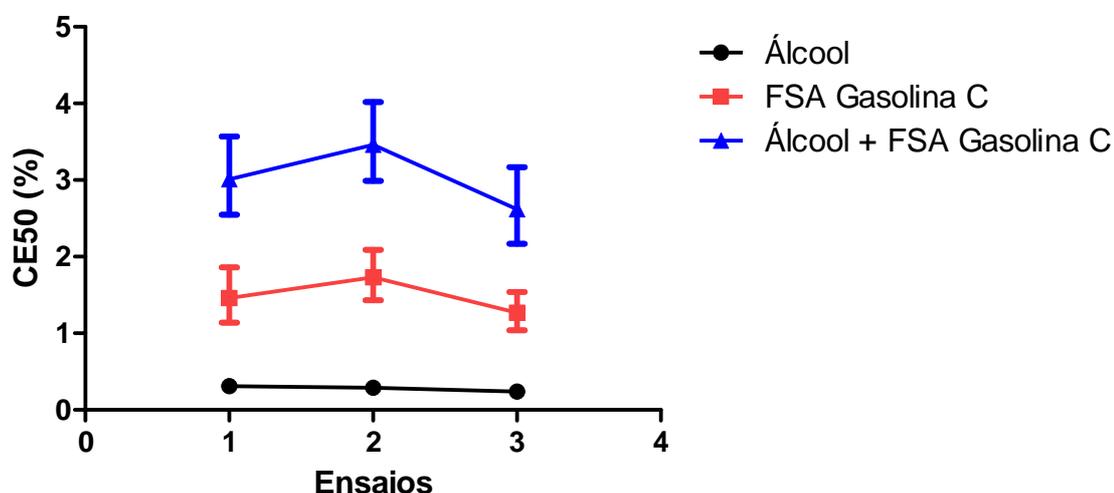


Tabela 16 - Toxicidade aguda para *D. similis* e aditividade decorrente da mistura Álcool e FDA da Gasolina C.

Série de ensaios	Combustíveis estudados	CE50; 48 h (%)		Soma da aditividade	Índice de aditividade S(-1) + 1
		CE50 (%) do combustível individualmente	Conc. do combustível na mistura*		
1	Álcool	0,31	0,590	3,17	-2,17
	FDA Gas. C	1,86	2,360		
2	Álcool	0,29	0,686	4,29	-3,29
	FDA Gas. C	1,42	2,744		
3	Álcool	0,24	0,488	3,16	-2,16
	FDA Gas. C	1,73	1,952		
Índice de aditividade (valor médio dos três ensaios)					-2,54

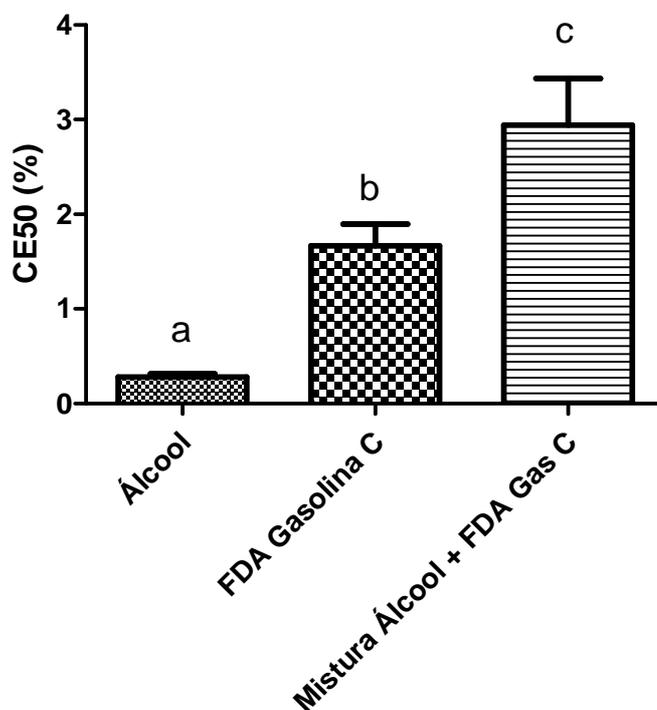
*concentração que causa efeito em 50% dos organismos expostos.

Os valores de S calculados (soma das ações tóxicas) foram no caso da mistura Álcool + FDA da Gasolina C, superiores a 1. Conclui-se, portanto, que nas três séries de ensaio o efeito é menos que aditivo (antagonismo).

O índice de aditividade (IA) calculado sobre os dados obtidos da mistura Álcool + FDA da Gasolina C significa que a toxicidade conjunta da mistura é 2,54 vezes menor que a soma da toxicidade dos combustíveis testados isoladamente.

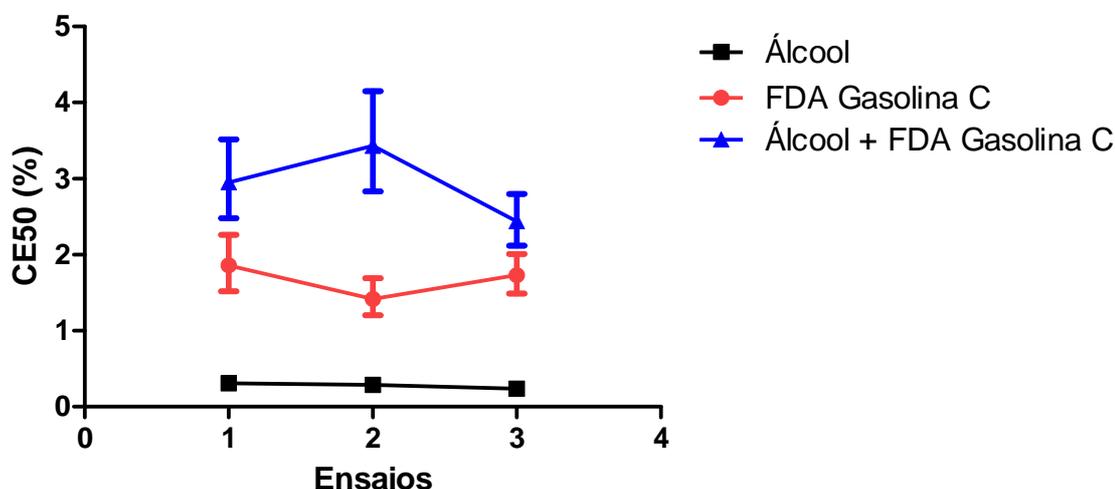
Para esta análise estatística o controle não foi considerado, uma vez que não houve mortalidade no controle superior a 50%, desta forma, a CE50 (%) não foi calculada. O tratamento que apresentou menor CE50 (%) foi o ensaio com álcool, o que indica maior toxicidade. Os três ensaios apresentaram diferença significativa entre si ($p < 0,05$) (Figura 26).

Figura 26 – Médias e desvios-padrão (d.p.) relativos à série de três ensaios dos combustíveis Álcool e FDA da Gasolina C individuais e em mistura.



Na Figura 27, é possível observar pelo gráfico que a mistura Álcool + FDA Gasolina C apresentou os maiores valores de CE50 em comparação com a FDA da Gasolina C e o Álcool.

Figura 27 – Valores de CE50 48 h (%) com os limites de confiança superiores e inferiores relativos aos três ensaios com Álcool, FDA da Gasolina C e da mistura binária Álcool + FDA da Gasolina C.



A escassez de trabalhos disponíveis na literatura com a utilização da mistura de combustíveis utilizando bioindicadores dificulta a comparação dos resultados obtidos na presente dissertação, haja visto que poucos estudos foram realizados no sentido de investigar as causas de sinergismo ou antagonismo entre os derivados de petróleo (CHUKWUAND; OKHUMALE, 2009).

Poucos estudos relacionam o álcool combustível em ensaios de mistura, apesar do álcool ser utilizado em mistura com gasolina em países como Brasil, Estados Unidos, União Européia, México, Índia, Argentina, Colômbia e, mais recentemente, no Japão. Por outro lado, o uso de álcool sozinho como combustível está concentrado no Brasil, que hoje é o maior exportador e segundo maior produtor mundial de álcool.

Hernando et al. (2003) realizaram uma série de experimentos utilizando misturas de MTBE (éter metil terciário butílico) com diversos pesticidas. O MTBE teve seu uso difundido como um oxidante do combustível em gasolina, essa substância contamina as águas subterrâneas, água potável e outros organismos aquáticos. Este estudo observou que a presença de MTBE aumentou a toxicidade de vários pesticidas (Diuron, Diclofluanida, TBT e Linuron). Foi observado, por exemplo, que a presença de MTBE aumentou a toxicidade do Diuron em mais do que 50%, quando testada com o ensaio de *V. fischeri* (5, 15 e 30 min de exposição).

Além disso, a resposta tóxica manifestou-se dentro de 5 min enquanto que sem o MTBE a mesma resposta surgiu apenas após 30 min de exposição. A presença de MTBE aumentou também a toxicidade do diclofluanida em 30%, quando medido com o ensaio de *D. magna*. Os autores concluíram neste estudo que a presença de MTBE aumentou substancialmente a toxicidade de outros poluentes, tais como os pesticidas que estão frequentemente presentes no mesmo ambiente que o MTBE, indicando que para a maior parte das amostras analisadas, ocorreu sinergismo.

O experimento conduzido por Muñoz e Tarazona (1993) teve como objetivo determinar a toxicidade aguda dos quatro Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (antraceno, fenantreno, acenafteno e naftaleno), frequentemente detectados em sistemas de água doce, devido à contaminação por óleo, bem como quais seriam os efeitos das misturas entre os quatro HPAs, em *Daphnia magna*. Os resultados obtidos neste estudo indicaram que HPAs com três anéis aromáticos, fenantreno e antraceno, foram mais tóxicos do que HPAs com dois anéis, acenafteno e naftaleno. O composto antraceno foi o mais tóxico (CE50-48h: 95 µg/L) e o naftaleno foi o menos tóxico (CE50-48h: 2194 µg/L). Este estudo corrobora com os dados de Passino-Reader, Hickey e Ogilvie (1997) que relaciona o aumento da toxicidade com o aumento do número de anéis aromáticos. De acordo com os autores do estudo, efeitos sinérgicos entre diferentes HPAs devem ser esperados, entretanto, os resultados mostraram que a ação tóxica para os quatro HPAs estudados resultaram em um efeito inferior ao esperado caso ocorresse efeito aditivo (antagonismo). Apesar dos autores utilizarem outra metodologia para analisar os efeitos das misturas, este trabalho foi similar ao encontrado na presente dissertação.

Chukwuand e Okhumale (2009) realizaram experimentos com três produtos refinados de petróleo: gasolina, querosene e diesel e a mistura binária entre eles, utilizando a tilápia *Oreochromis niloticus* como organismo-teste. Eles observaram a mortalidade dos organismos com 96 h de exposição. Para o ensaio com as misturas, os organismos foram expostos às seguintes concentrações gasolina e querosene (1:1); gasolina e querosene (1:6); gasolina e diesel (1:1); gasolina e diesel (1:2); diesel e querosene (1:1); diesel e querosene (1:3). Os autores evidenciaram que a gasolina é mais tóxica e é o combustível que mais contribui para a toxicidade da mistura. Para avaliar os efeitos da mistura dos combustíveis, os autores utilizaram testes com base em modelos de concentração de adição, as interações entre os compostos nas várias proporções apresentou grande parte, efeitos sinérgicos,

exceto para a gasolina de querosene (1:1), que foi apresentada efeitos aditivos. Eles concluíram que a toxicidade do querosene e do diesel foi grandemente aumentada na presença de gasolina.

Em um estudo que utilizou *D. similis* como organismo-teste e outros contaminantes, Prestes, Jonsson e Castro (2012) avaliaram a inibição da mobilidade de formulações fungicidas à base de piraclostrobin e epoxiconazol, isoladamente e em mistura sobre *Daphnia similis*, mediante determinação da Concentração Efetiva Média (CE50-48h) de cada uma das formulações. Também foi determinado o possível efeito sinérgico ou antagônico que o uso conjugado dos dois fungicidas poderia exercer em relação à sua toxicidade. Foram encontrados valores de CE50-48h de 18,36 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para a formulação à base de piraclostrobin, de 89,98 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para a formulação à base de epoxiconazol e de 23,50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para a mistura. A determinação do Índice de Aditividade (IA) sugere que a mistura dos princípios ativos exerceu apenas efeito toxicológico aditivo sobre o organismo-alvo.

Boillot e Perrodin (2008) avaliaram experimentalmente em laboratório, os efeitos combinados de soluções de misturas contendo glutaraldeído e surfactantes em *Daphnia*, neste estudo os autores observaram efeitos antagônicos da mistura.

Zagatto (1995) analisou o efeito de dois algicidas individualmente e em mistura sobre *Daphnia similis*. Foi utilizado o sulfato de cobre e o peróxido de hidrogênio e os resultados dos ensaios foram expressos em CE50; 48 h, em mg/L. Através dos ensaios de toxicidade aguda com *Daphnia*, Zagatto (1995) verificou que a toxicidade da mistura dos dois algicidas, em diferentes proporções, se revelou inferior à soma da toxicidade de cada uma das duas substâncias individualmente. Utilizando o modelo proposto por Marking (1977), o autor concluiu que os efeitos interativos desses dois algicidas em misturas são menos que aditivos (antagonismo).

Na presente dissertação, a interação entre a gasolina e suas frações com o álcool, evidenciou também toxicidade inferior à esperada caso ocorresse efeito aditivo (antagonismo).

De acordo com Parvez, Venkataraman e Mukherji (2009), muitos fatores são responsáveis pelo comportamento toxicidade de uma mistura, tais como coeficiente de partição octanol-água ($\log K_{ow}$), polaridade de produtos químicos, índice de conectividade de valência e a composição da superfície celular do organismo-teste.

Uma explicação para que as três misturas apresentassem efeitos antagônicos é o fato que dentre os três combustíveis estudados, o álcool apresenta um valor de

coeficiente de partição octanol-água de -0,31 (Tabela 6) que é um valor muito baixo em comparação ao das gasolinas. É possível que a presença do álcool com a gasolina e suas frações, faça com que estas misturas fiquem com um $\log K_{ow}$ menor, conseqüentemente, volatilizam-se facilmente e tornam-se menos lipofílicas.

Cruz, Carvalho e Stragevitch (2003), realizaram medições de pressão de vapor de uma gasolina petroquímica aditivada com etanol anidro e constatou que a adição de álcool à gasolina afeta significativamente sua volatilidade, promovendo a quebra das ligações intermoleculares dos hidrocarbonetos, facilitando assim sua evaporação e sendo observado o aumento da pressão. Este estudo também auxilia a entender melhor os efeitos antagônicos obtidos nesta dissertação, uma vez que a adição de álcool contribuiu para a diminuição da toxicidade da mistura.

4.2. Etapa II: Avaliação ecotoxicológica em área com histórico de contaminação por gasolina

4.2.1. Ensaio ecotoxicológicos com amostras de água subterrânea

A Tabela 17 apresenta as principais características físicas e químicas das amostras de água subterrânea obtidas em área de contaminação antiga por gasolina.

Tabela 17 – Principais parâmetros físico-químicos das amostras de água subterrânea em área com contaminação antiga por gasolina.

PARÂMETROS	*V.O.	P1	P2
COT (mg/L)	-	1,18	36,8
DQO (mg/L)	-	4,5	147,2
TPH - GRO (µg/L)	-	150	322513,2
BTEX			
Benzeno (µg/L)	5	<i>0,45</i>	6046
Tolueno (µg/L)	170	<i>0,45</i>	25048
Etilbenzeno (µg/L)	200	<i>0,45</i>	3472
m,p-Xilenos (µg/L)	300	<i>0,45</i>	17584
o-Xileno (µg/L)		<i>0,45</i>	7954

*Valor Orientador – Portaria Nº 2914/11 do Ministério da Saúde. Valores em itálico representam metade do Limite de Detecção (LD). Em negrito, são concentrações acima dos V.O.

Analisando-se os resultados da Tabela 17, observa-se que a amostra de água subterrânea P2 apresenta valores extremamente altos de TPH-GRO (322513,2 µg/L) e dos monoaromáticos individuais do grupo BTEX. Estes compostos merecem maior preocupação, devido à toxicidade e solubilidade em água. O benzeno, um dos compostos mais perigosos, apresentou concentração de 6046 µg/L o que é 1200 vezes maior que o Valor Orientador (5 µg/L) adotado pela Portaria Nº 2914/11 do Ministério da Saúde.

O tolueno na amostra P2 apresentou um resultado de 147 vezes maior que o Valor Orientador. Trata-se de composto bastante tóxico e se ingerido, provoca depressão no sistema nervoso central.

O fato das amostras de água subterrânea serem muito ou moderadamente tóxicas mesmo depois de longo tempo de ocorrido o derramamento sugere o

aprisionamento desses hidrocarbonetos na faixa saturada, prolongando a presença dos mesmos no ecossistema, apesar da alta volatilidade desses compostos.

Os resultados referentes aos ensaios de toxicidade aguda com *D. similis* expostas a amostras de água subterrânea obtidas de uma área com contaminação antiga por gasolina são apresentados na Tabela 18. Para o controle negativo dos ensaios utilizou-se água reconstituída.

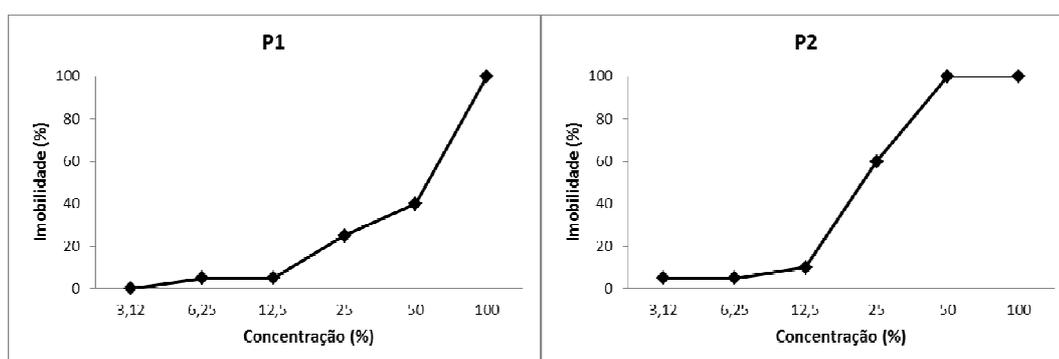
As curvas de toxicidade aguda (Figura 28) indicam a imobilidade dos organismos obtida após 48 h de exposição para as concentrações geradas a partir de cada amostra ambiental de água subterrânea utilizando *D. similis*. Os resultados dos ensaios foram expressos em CE50 (%) e em Fator de Toxicidade (FT). Não houve organismos afetados no controle.

Tabela 18 - Resultados dos ensaios de toxicidade com *D. similis* com amostras de água subterrânea em área com contaminação antiga por gasolina.

Amostra	CE50 (%) 48h	FT
P1	44,54	8
P2	22,14	8

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 18 as duas amostras de água subterrânea apresentaram toxicidade relevante. Analisando-se a CE50 das duas amostras verifica-se que a P2 foi duas vezes mais tóxica que a P1. De acordo com a escala de toxicidade (Tabela 10), a amostra P1 seria classificada como sendo tóxica e a P2 muito tóxica.

Figura 28 – Curvas de toxicidade aguda para as amostras de água subterrânea e diluições para *D. similis* após 48 h de exposição.



4.2.2. Ensaio ecotoxicológico com amostras de água superficial

A Tabela 19 apresenta as principais características das amostras de água superficial em área alagada com histórico de contaminação por gasolina.

Tabela 19 – Principais parâmetros físico-químicos das amostras de água superficial em área com contaminação antiga por gasolina.

PARÂMETROS	*V.O.	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8
pH	6 a 9	6,47	7,6	7,06	6,28	6,68	6,01	6,31	6,1
Condutividade	-	110,9	77,9	167,2	125,4	210,4	84,5	167,2	-
TPH - GRO (µg/L)	-	150	1833,1	1854,3	391,6	359,4	463,2	735,4	150
COT (mg/L)	-	27	22,6	103	20	92,6	20,1	19,0	36
DQO (mg/L)	-	298,8	564,9	1986,8	214,2	689,8	468,3	367,7	173
BTEX									
Benzeno (µg/L)	5	0,45	7,804	197,6	47,03	15,34	27,67	74,1	0,45
Tolueno (µg/L)	2	0,45	0,45	0,45	7,354	5,178	5,926	18,72	17,79
Etilbenzeno (µg/L)	90	0,45	0,45	0,45	2,4	0,45	3,618	0,45	0,45
m,p-Xilenos (µg/L)	300	0,45	31,7	13,79	6,815	7,423	8,41	2,515	0,45
o-Xileno (µg/L)		0,45	23,26	11,78	0,45	4,122	0,45	5,49	0,45

*Valor Orientador – CONAMA 357/2005: Classe 1 – Águas doces.

Os resultados referentes aos ensaios de toxicidade aguda com *D. similis* expostas às amostras de águas superficiais da área de contaminação antiga por gasolina, são apresentados na Tabela 20. Para o controle negativo do ensaio utilizou-se água reconstituída. As curvas de toxicidade aguda (Figura 29) indicam a imobilidade dos organismos obtida após 48 h de exposição para as concentrações utilizadas em cada amostra de água superficial utilizando *D. similis*. Os resultados dos ensaios foram expressos em CE50 (%) e em Fator de Toxicidade (FT). Não houve organismos afetados no controle.

Tabela 20 - Resultados dos ensaios de toxicidade aguda com *Daphnia similis* com amostras de água superficial em área com contaminação antiga por gasolina.

Amostra	CE50 (%) 48h	FT
A1	NC	1
A2	NC	2
A3	NC	1
A4	NC	1
A5	NC	1
A6	NC	1
A7	NC	1
A8	NC	1

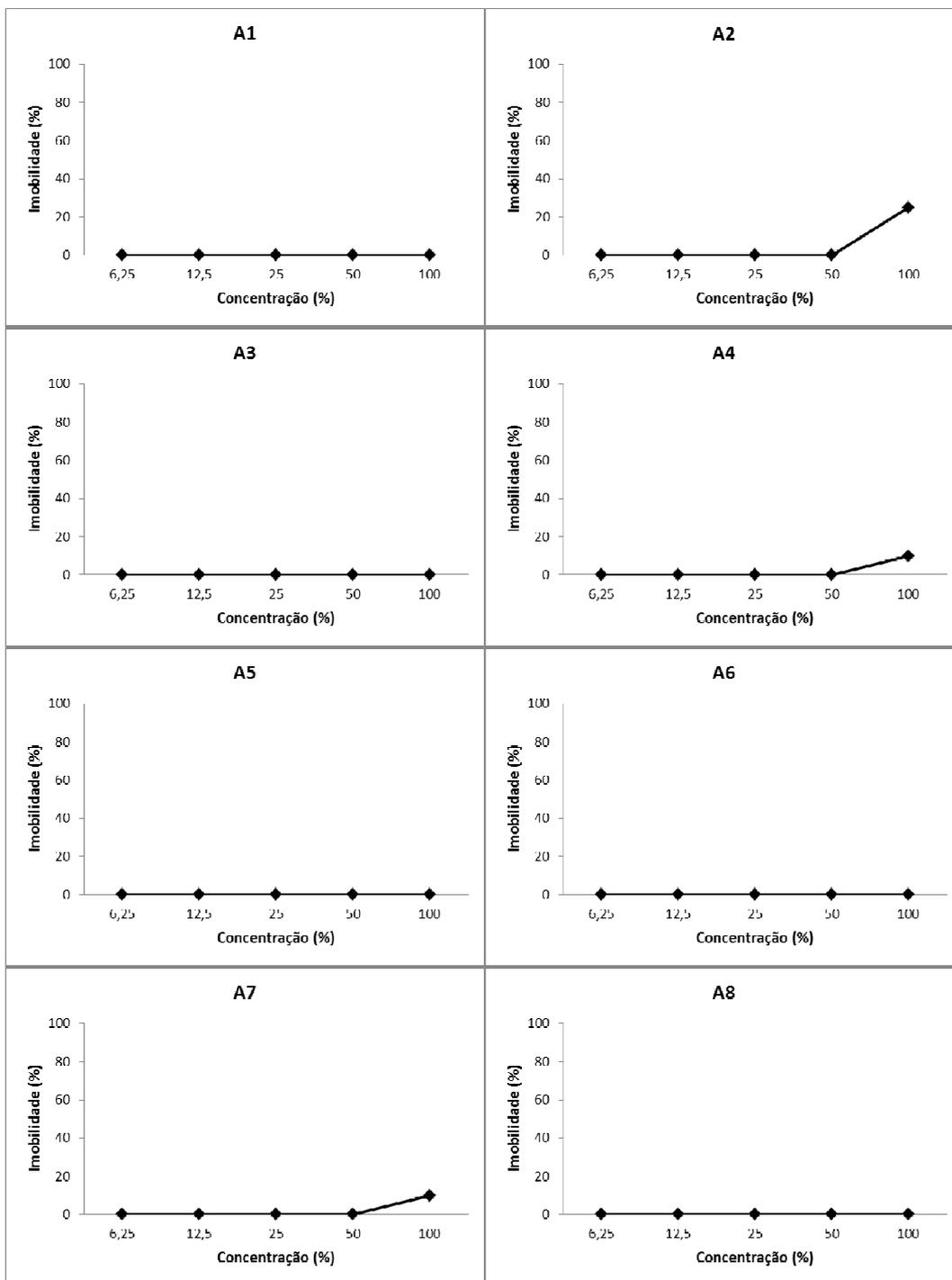
NC: Não calculado.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 20, não foi observada imobilidade superior a 50% dos organismos em nenhuma das 8 amostras de água superficial e, portanto, a CE50(%) não foi calculada.

Todas as 8 amostras foram classificadas como sendo não tóxicas segundo a Tabela 10. A baixa toxicidade destas águas pode estar relacionada, com o fato do derramamento ter ocorrido há mais de dois anos e como grande parte da gasolina é composta por frações leves que evaporam rapidamente quando presentes em ambientes abertos, como a área alagada em questão.

Adicionalmente, analisando a Tabela 19 pode-se observar que os valores encontrados para o benzeno estavam acima do Valor Orientador em 6 das 8 amostras analisadas e o tolueno em 5 das 8. Tais amostras não conferiram toxicidade para as *Daphnias*.

Figura 29 – Curvas de toxicidade aguda e diluições para cada amostra de água superficial para *D. similis*, obtidas após 48 h de exposição.



4.2.3. Ensaio ecotoxicológicos com amostras de sedimento

A caracterização física e química das amostras de sedimentos é apresentada na Tabela 21.

Tabela 21 - Principais parâmetros físico-químicos das amostras de sedimento em área com contaminação antiga por gasolina.

PARÂMETROS	V.O.*	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8
Argila (%)	-	40	49,6	63,3	40,5	40,7	46,4	42,7	15,7
Silte (%)	-	57	43	35,1	48,6	51,9	46,2	49,3	61,3
Areia Total (%)	-	3	7,17	1,69	10,6	7,14	7,36	7,91	22,7
COT (%)	10	1,67	30,7	6,82	16,3	19,4	4,83	16	28,3
TPH-GRO ¹	-	1215,5	23178	34500	2640,8	3826,5	45526,6	2411,6	2830,2
BTEX ¹									
Benzeno	60	3,645	206,9	226,3	442,5	11,5	220,3	77	8,5
Tolueno	30000	3,645	16,3	7,1	125,9	11,5	15,95	86,2	8,5
Etilbenzeno	35000	3,645	756,5	657,9	283	11,5	880,7	7,25	8,5
m,p-Xilenos	25000	3,645	3849,7	3475,7	1255,8	658,9	2308,5	282,4	8,5
o-Xileno		3,645	2919,1	1133,7	722,7	274,1	904,1	169,1	8,5

*Valor Orientador – CONAMA 420/2009: Solo – Valor de Investigação.

¹mg/kg de peso seco

Os resultados referentes aos ensaios de toxicidade aguda com *D. similis* expostas aos sedimentos obtidos de área alagada com histórico de contaminação por gasolina são apresentados na Tabela 22. Para o controle negativo do ensaio utilizou-se apenas água reconstituída.

As curvas de toxicidade aguda, na Figura 30, indicam a imobilidade dos organismos obtida após 48 horas de exposição para as concentrações utilizadas em cada amostra de sedimento utilizando *D. similis*. Os resultados dos ensaios foram expressos em CE50 (%) e em Fator de Toxicidade (FT).

Tabela 22 - Resultados dos ensaios de toxicidade com *D. similis* com amostras de sedimento em área com contaminação antiga por gasolina.

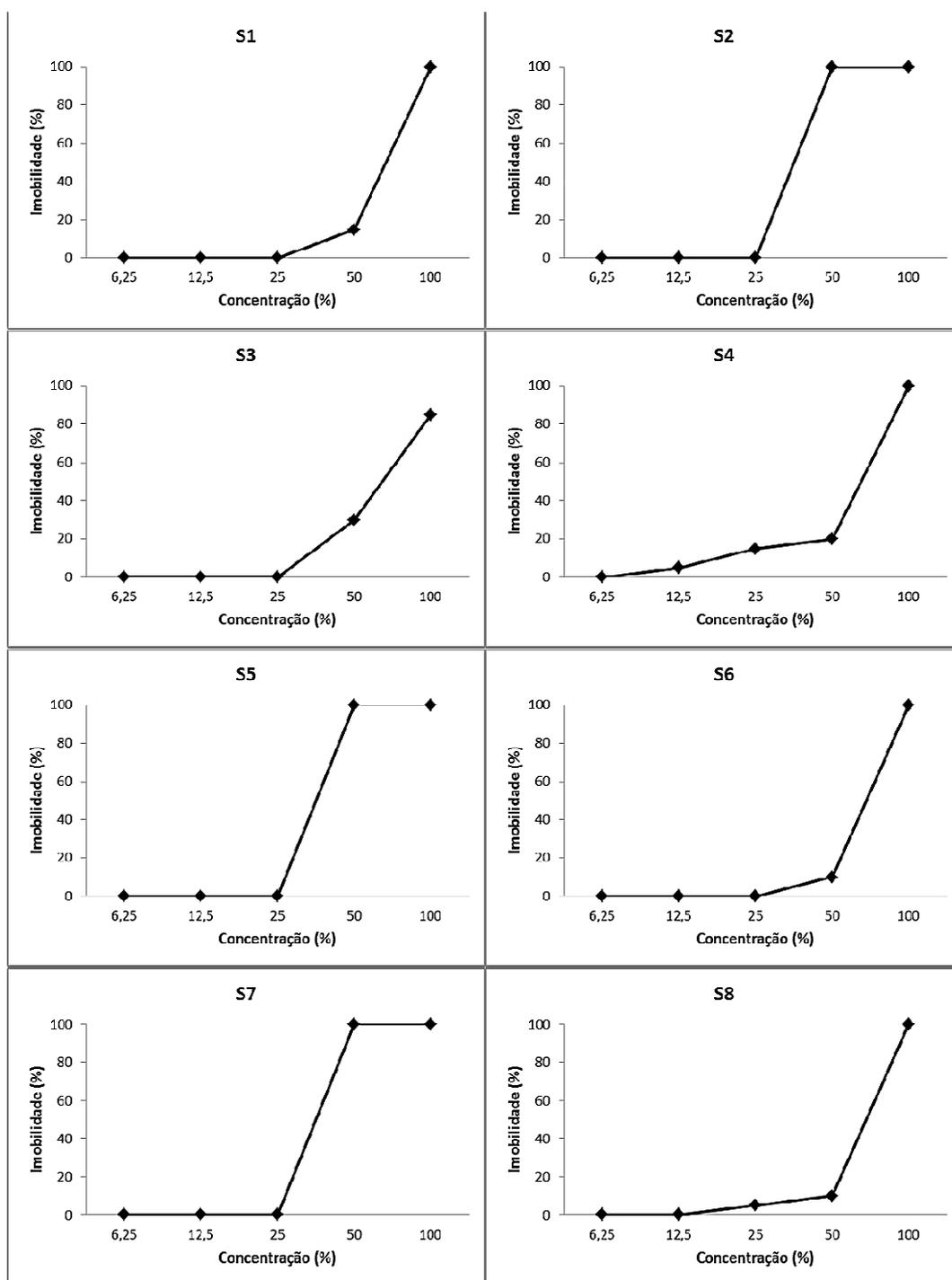
Amostra	CE50 (%) 48h	FT
S1	63,73	4
S2	35,36	4
S3	63,26	4
S4	53,59	8
S5	70,71	2
S6	65,98	2
S7	68,30	2
S8	63,73	2

Ao analisar a Tabela 21, pode-se notar que o benzeno foi novamente o composto que ultrapassou o limite do Valor Orientador: de 8 amostras, 5 estavam com concentrações acima. A toxicidade encontrada nos ensaios com sedimento, sob a forma de elutriado, para *D. similis* pode ser devida a outros parâmetros não analisados como metais, compostos persistentes orgânicos, entre outros.

Os resultados dos ensaios granulométricos indicaram um alto teor de argila e silte (frações mais finas) para as amostras de sedimento analisadas. O ensaio granulométrico compõe estudos de análise de risco onde o tipo de solo é um dos fatores que influenciam o deslocamento de contaminantes. A quantidade de contaminantes adsorvidos é regida pela proporção de argila presente no solo/sedimento. Solos com maior conteúdo de argila apresentam maiores teores de contaminantes adsorvidos. (VARZACACOU, 2009; FELIX; NAVICKIENE; DÓREA, 2007).

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 22, comparando o CE50(%) das nove amostras de sedimentos verifica-se de acordo com a Tabela 10 que as amostras S1, S3 ao S8 são classificadas como sendo moderadamente tóxicas, enquanto que a amostra S2 se classificaria como sendo tóxica.

Figura 30 - Curvas de toxicidade aguda para amostras de sedimentos para *D. similis*, obtidas após 48 horas de exposição.



A maioria dos artigos sobre contaminação ambiental por derivados de petróleo estão relacionados ao impacto sobre os organismos marinhos (DAVISON et al., 1993; BARRON et al, 1999; PAIXÃO et al., 2007; TATEM; COX; ANDERSON, 1978; RODRIGUES et al, 2010; BARATA et al., 2005; KOYAMA, KAKUNO, 2004; NEFF et al., 2000; VERA; TAM; PINTO, 2009; KATSUMITI et al., 2009), visto que o

meio marinho é o ambiente mais propício a ocorrer um derramamento acidental (casos dos navios petroleiros *Exxon Valdez* em 1989 no Alasca e do *Prestige* em 2002 na costa da Galícia, este último afetou todas as atividades ligadas a maricultura e pesca, bem como o valor turístico de vários trechos da costa), devido à exploração de petróleo no mar e à constante travessia de grandes petroleiros. Poucas espécies de água doce são estudadas, o gênero onde há mais estudos relacionados é o da *Daphnia* (SOUTHWORTH; BEAUCHAMP; SCHMIEDER, 1978; BHATTACHARYYA; KLERKS; NYMAN, 2003; ABERNETHY et al., 1986; TRUCCO; ENGELHARDT; STACEY, 1983; RATUSHNYAK et al., 2009).

A bibliografia sobre ensaios ecotoxicológicos com compostos derivados do petróleo apesar de ser vasta, poucos são os estudos que possam ser comparativos com este, pelo organismo-teste escolhido e pelo tipo de ensaio aplicado.

Há uma variedade de resíduos produzidos por ou associados com a produção de petróleo e gás offshore. Estes incluem água de produção, fluidos de perfuração à base de óleo e à base de água, óleo oriundo de processos de extração e combustível/diesel provenientes de navios e equipamentos.

Uma grande variedade de compostos de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos foi identificado no sedimento, água e biota da região dos Grandes Lagos e de seus afluentes. As fontes de contaminação são de resíduos químicos das regiões industrializadas circundantes dos Estados Unidos e Canadá. Um dos objetivos do estudo de Passino-Reader, Hickey e Ogilvie (1997) foi determinar a toxicidade de vários tipos de hidrocarbonetos policíclicos dos Grandes Lagos em *Daphnia pulex*. Os reagentes químicos foram comprados com grau de pureza > 99%.

Os compostos testados foram previamente identificados nos Grandes Lagos quando não havia o mesmo composto comercialmente disponível, foram comprados reagentes com estruturas químicas parecidos. Os resultados de alguns compostos em CE50 48 h foram: 1,1,3-trimetilciclohexano: 1,0 mg/L; biciclohexil: 0,035 mg/L; bifenilo: 1,6 mg/L, ciclohexilbenzeno: 0,55 mg/L; 9,10-dihidroantraceno: 0,56 mg/L; 9,10-dihidrofenantreno: 0,42 mg/L; dicitlopentadieno: 4,2 mg/L. Os autores concluíram neste estudo que a toxicidade está relacionado com o tamanho e aromaticidade da molécula. Houve um aumento da toxicidade com o aumento do número de anéis para os hidrocarbonetos poliaromáticos.

Trucco, Engelhardt e Stacey (1983) realizaram experimentos de toxicidade e acumulação expondo *Daphnia pulex* a cinco hidrocarbonetos aromáticos: benzeno, naftaleno, fenantreno, benzoantraceno e benzopireno. A acumulação foi avaliada sob três condições: somente com a água contaminada, a partir de algas pré-acumuladas com os hidrocarbonetos e a partir de um meio em que água e algas foram contaminadas. Os autores verificaram que a toxicidade dos cinco hidrocarbonetos aromáticos mostraram uma relação direta com o peso molecular, além disso, observaram que o benzeno foi o menos acumulado, enquanto o naftaleno mostrou a maior absorção, especialmente das algas.

Southworth, Beauchamp e Schmieder (1978), avaliaram a extensão e a velocidade com que o HPA em ambientes aquáticos são acumulados pelo zooplâncton, *Daphnia pulex*. Estudos comprovaram que *Daphnias* podem acumular compostos orgânicos hidrofóbicos como o DDT (CROSBY; TUCKER, 1971), hexaclorociclohexano (CANTON et al., 1975), e o antraceno (HERBES; RISI, 1978). A acumulação de HPAs em organismos pode ser explicado por uma propriedade física denominada coeficiente de partição octanol-água. Neste experimento foi medido a relação da concentração de HPA na *Daphnia*/concentração de HPA na água, o efeito combinado do aumento da concentração de HPA na *Daphnia* e a diminuição da concentração de HPA na água produz uma curva de bioacumulação. HPAs foram concentrados em *Daphnia* cerca de 10.000 vezes para o benzoantraceno e cerca de 100 vezes para o naftaleno.

Um estudo desenvolvido por Ratushnyak et al. (2009) investigou o efeito do petróleo e seus produtos refinados sobre *Daphnia magna*. Os autores compararam os efeitos da toxicidade aguda e crônica sobre *D. magna* e avaliaram o grau de toxicidade dos compostos testados. Os efeitos tóxicos são reduzidos na seguinte direção: óleo diesel > petróleo bruto > benzina A-76 > extrato aquoso de benzina A-93 > extrato aquoso de benzina A-76. Os efeitos crônicos observado foram redução da fertilidade e diminuição da sobrevivência.

As espécies do gênero *Daphnia* parecem ser mais resistentes a benzeno do que as de peixe. Duas espécies de microcrustáceos, *Daphnia pulex* e *Daphnia magna*, foram empregadas em testes de toxicidade aguda tendo o benzeno como agente tóxico. Para a USEPA (1980), a CL50, 48 horas para *D. magna* situou-se entre 203 e 620 mg/L e para *D. pulex*, esses valores situaram-se entre 265 e 345

mg/L. Pouco se sabe sobre a toxicidade do tolueno para *Daphnia magna*, segundo a USEPA (1980), esses valores situam-se entre 60 e 313 mg/L.

Galassi et al. (1988) e Tosato et al. (1993) testaram a toxicidade de alguns aromáticos sobre *Daphnia magna*, e os valores de CE50 referente ao benzeno foram muito similares para ambos, 231 μM descrito no primeiro estudo, e 223,9 μM evidenciado no segundo trabalho. Os valores de CL50 (48 h) referente ao tolueno foram, respectivamente, 76 μM e 69,2 μM .

Khan, Warith e Luk (2007) avaliaram os efeitos da toxicidade aguda do biodiesel puro, misturas de biodiesel e diesel e diesel puro em *Oncorhynchus mykiss* e *Daphnia magna*. Os resultados expressos em CL50-24h para *Daphnia magna* foram: diesel: 1,78 ppm; B100: 4,65 ppm; B50: 3,29 ppm; B20: 4,54 ppm e B5 1,98 ppm, onde B100 representa 100% do biodiesel; B50, uma mistura de 50% de diesel e biodiesel; B20, 20% de biodiesel e B5, 5% de biodiesel. Para o ensaio de toxicidade aguda com o peixe *Oncorhynchus mykiss*, os autores obtiveram as seguintes CL50-96h: diesel: 354,01 ppm; B100: 710,17 ppm; B50: 372,71 ppm; B20: 693,05 ppm; B5: 402,00 ppm. Os autores concluíram que o biodiesel e misturas de diesel e biodiesel produzidos a partir de óleos não comestíveis são consideravelmente menos tóxicos para os organismos aquáticos que o diesel convencional. Levando-se em conta suas excelentes propriedades de combustão e biodegradabilidade, o biodiesel ser considerado uma alternativa viável em relação ao diesel. Apesar do biodiesel e das misturas de diesel com biodiesel serem menos tóxicas que o diesel convencional, os resultados deste estudo demonstram que o risco para os organismos aquáticos, é ainda bastante substancial.

Abernethy et al. (1986) estudou as toxicidades agudas de 38 hidrocarbonetos e hidrocarbonetos clorados para dois crustáceos planctônicos, *Daphnia magna* de água doce e de água salgada *Artemia*. Em ambos os casos concentrações médias letais (valores CL50) às 48 h e 24 h, respectivamente, foram fortemente correlacionada com a solubilidade aquosa. Alguns dos valores de CL50 encontrados para *Daphnia*: benzeno 400 mmol/m^3 ; tolueno 125 mmol/m^3 ; etilbenzeno 20 mmol/m^3 ; p-xileno 80 mmol/m^3 ; m-xileno 90 mmol/m^3 ; o-xileno 30 mmol/m^3 ; naftaleno 36,9 mmol/m^3 ; bifenil 7,1 mmol/m^3 ; fenantreno 1,16 mmol/m^3 ; antraceno 0,2 mmol/m^3 ; pireno 0,45 mmol/m^3 ; diclorometano 1599 mmol/m^3 ; triclorometano 662 mmol/m^3 ; clorobenzeno 51,6 mmol/m^3 ; 1,2-diclorobenzeno 16 mmol/m^3 ; pentaclorobenzeno 1,2 mmol/m^3 .

Niederlehner, Cairns e Smith (1998) estudaram a toxicidade aguda e crônica dos BTEX. Segundo os autores, a CL50(48h) de benzeno e tolueno para o microcrustáceo *Ceriodaphnia dubia* foram, respectivamente, 221 μ M e 41 μ M. Marchini et al. (1993), estudando a mesma espécie, encontrou os valores de 236 μ M e 97,7 μ M. O tipo de sistema de teste aplicado pelos autores foi em sistema fechado, para minimizar a volatilização dos compostos, porém com renovação da solução-teste.

A toxicidade de efluentes derivados da indústria do petróleo tem sido mundialmente avaliada principalmente, através de ensaios ecotoxicológicos com organismos marinhos e estuarinos. Ihara (2008) avaliou a toxicidade da água de produção utilizando a diatomácea *Skeletonema costatum*, o copépodo *Acartia tonsa* e o misidáceo *Mysidopsis juniae*. Neste estudo, a autora obteve uma CE50 (72h) de 13,41% no ensaio com *S. costatum*, CL50 (48h) obtida para o copépodo *A. tonsa* 11,56% e uma CL50 (96h) de 3,2% para o misidáceo *M. juniae*.

Vera, Tam e Pinto (2009) realizaram ensaios ecotoxicológicos para determinar os efeitos do petróleo cru, diesel e querosene sobre o crescimento populacional da diatomácea *Chaetoceros gracilis*, determinou-se neste estudo a CE50 (96 horas) como conclusão os autores verificaram que o mais tóxico foi a solução com diesel (90 mg.L⁻¹), seguido por solução de querosene (98 mg.L⁻¹) e a solução com o petróleo bruto (867,5 mg.L⁻¹).

Paixão et al. (2007), realizou experimentos com a Fração Solúvel em Água de 14 tipos diferentes de formulações de gasolina em *Tetraselmis chuii* (cultura de microalgas) e *Crassostrea rhizophorae* (embriões). As microalgas e os embriões das ostras foram expostos a diferentes concentrações de frações solúveis em água (FSA) da gasolina, durante 96 e 24 h, respectivamente. Os endpoints CL50-96h (concentração que provoca 50% de inibição do crescimento em culturas de microalgas) e CE50-24h (concentração que provoca anormalidades em 50% dos embriões expostos) foram analisados. Para os testes de microalgas, obteve-se 100% da FSA de cada formulação de gasolina e os componentes foram dosados em uma série de diluição geométrica (0%, 4,6%, 10,0%, 22,0%, 46,0% e 100%). As mesmas diluições de formulações de gasolina e os seus componentes foram aplicados ao teste de desenvolvimento embrionário da ostra, por um período de 24h. Como outros produtos petroquímicos, a gasolina contém hidrocarbonetos aromáticos especialmente benzeno e derivados contaminantes, associados a alguns

compostos aromáticos policíclicos. Estes compostos apresentam capacidade de dissolução variável, de acordo com a sua estrutura e propriedades químicas. O resultado do ensaio com embriões expresso em CE50-24h variou muito com as 14 formulações da gasolina (1,37 – 32,36%), para o ensaio com a microalga *Tetraselmis chuii* as CL50-96h variaram muito também (4,93 – 96,52%).

O ensaio com sedimento, sob a forma de elutriato, é realizado com a mistura de quantidades pré-determinadas de sedimento e água de diluição para a obtenção de resultados mais próximos das características de uma ressuspensão ou de uma dragagem (USEPA, 1998). Em estudo realizado no estado do Espírito Santo, foi utilizada a bactéria luminescente *Vibrio fischeri* para avaliar impactos causados por derramamentos de óleo diesel e óleo combustível. Estudando sedimento, verificou-se que mesmo após 7 meses decorridos do derramamento de óleo diesel e 2 anos após o acidente com óleo combustível, os corpos d'água ainda apresentavam toxicidade para *V. fischeri* (D'ISEP et al., 2008).

Substâncias orgânicas com valores altos de coeficiente de partição octanol/água (K_{ow}) e moléculas carregadas negativamente podem acumular-se em grandes quantidades nos sedimentos e em sólidos suspensos. Eles podem diminuir os efeitos tóxicos de vários contaminantes, sobre determinados organismos, reduzindo a sua concentração livre, ao mesmo tempo aumentando a biodisponibilidade para outros organismos (WELTENS; GOOSSENS; PUymbroeck, 2000).

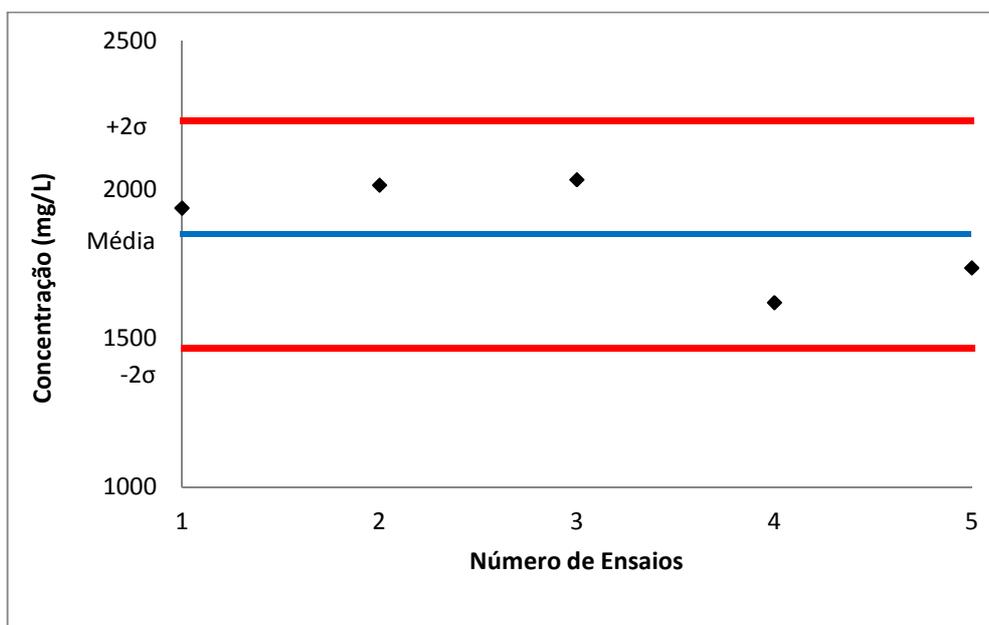
4.3. Ensaio de sensibilidade para *D. similis*

Foram realizados 5 ensaios de sensibilidade com NaCl como mostra a Tabela 22. A carta-controlé está representada na Figura 31. A média encontrada para os ensaios de sensibilidade foi 1868,70 mg/L; o desvio-padrão, 182,03 mg/L. O valor obtido no ensaio de sensibilidade deve estar compreendido num intervalo de ± 2 desvios-padrão em relação à média. O limite superior da carta é igual a 2232,76 mg/L e o limite inferior é 1504,64 mg/L.

Tabela 23 – Ensaio de sensibilidade de *D. similis* com Cloreto de Sódio (NaCl).

Ensaio	Data do ensaio	CE50 (mg/L) 48 h
1	08/05/2013	1938,23
2	18/06/2013	2015,12
3	16/07/2013	2033,33
4	21/08/2013	1620,28
5	17/09/2013	1736,57

Figura 31 – Carta-controlé do organismo *D. similis* para a substância de referência NaCl.



5. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que a Gasolina C adicionada diretamente na água foi 1.315 vezes mais tóxica que a fração solúvel-FSA da mesma gasolina e 1.477 vezes superior à obtida com a fração dispersa-FDA. Já a Gasolina P colocada diretamente na água de diluição apresenta uma toxicidade 303 vezes superior à FSA e 67 vezes superior à FDA da mesma.

A mistura da Gasolina C, sua FSA e FDA com o álcool resultou em efeito menos que aditivo (antagônico) no que tange à toxicidade a *D. similis*, sugerindo que a presença do álcool, embora aumente a dispersão da gasolina, diminui a toxicidade.

O ensaio simulando a contaminação antiga demonstrou uma clara redução da toxicidade, evidenciando que fatores como a evaporação propicia a volatilização dos compostos voláteis. Entretanto, as análises químicas, assim como a avaliação da toxicidade de amostras obtidas em área com histórico de contaminação antiga indicaram a presença de BTEX e TPH-GRO, além da toxicidade para as amostras de água subterrânea, indicando a permanência por aprisionamento desses compostos na zona saturada por tempo prolongado e ausência de intemperismo.

As amostras de sedimentos de área alagada também revelaram presença de hidrocarbonetos e toxicidade, indicando que tais compostos podem ter ficado adsorvidos na matriz ou podem ser provenientes da zona saturada.

Quanto às amostras de água superficial, apesar do benzeno ter ficado acima do Valor Orientador em 6 das 8 amostras, não houve toxicidade aguda para *D. similis*.

Os resultados do presente estudo contribuem para o aprofundamento dos conhecimentos acerca das interações gasolina e álcool em contaminações recentes e antigas.

6. SUGESTÕES PARA FUTURAS PESQUISAS

- Ampliação do número de bioindicadores de diferentes níveis tróficos em ensaios similares, com vistas a uma avaliação mais abrangente da ecotoxicidade de combustíveis, suas misturas e frações;
- Estudo da toxicidade crônica para uma avaliação mais completa dos efeitos da gasolina e suas misturas para os organismos;
- Tendo em vista o número relativamente reduzido de bioindicadores para sedimento, a produção de lixiviados para ensaios em matriz líquida pode ser uma estratégia a ser adotada;
- Quantificação dos hidrocarbonetos da gasolina e do etanol por cromatografia para as diferentes diluições e, principalmente nas FSA e FDA obtidas ao longo dos ensaios para melhor compreensão acerca da toxicidade dessas frações.

REFERÊNCIAS

ABERNETHY, S.; BOBRA, A.M.; SHIU, W.Y.; WELLS, P.G.; MACKAY, D. Acute lethal toxicity of hydrocarbons and chlorinated hydrocarbons to two planktonic crustaceans: the key role of organism-water partitioning. *Aquatic Toxicology*, v. 8, p. 163-174, 1986.

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS *Anuário Estatístico Brasileiro do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis*. ANP, Rio de Janeiro: 2013. 236 p.

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. *Public Health Assessment Guidance Manual*. ATSDR, 1992. 220 p.

AKAISHI, F.M.; SILVA DE ASSIS, H.C.; JAKOBI, S.C.G.; STJEAN, S.; COUTERNAY, S.C.; LIMA, E.; WAGNER, A.L.R.; SCOFIELD, A.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. Morphological and neurotoxicological findings in tropical freshwater fish (*Astyanax* sp.) after waterborne and acute exposure to water soluble fraction (WSF) of crude oil. *Archives Environmental Contamination Toxicology*, v. 46, p. 244-253, 2004.

ALBERS, P.H. Petroleum and individuals polycyclic aromatic hydrocarbons. 2003. Separata de: HOFFMAN, D.J.; RATTNER, B.A.; BURTON, G.A.; CAIRNS, J. (Eds.). *Handbook of Ecotoxicology*. Boca Raton: Lewis publishers, 2003. p. 341-371.

ALMEDA, R.; WAMBAUGH, Z.; CHAI, C.; WANG, Z.; LIU, Z.; BUSKEY, E.J. Effects of Crude Oil Exposure on Bioaccumulation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Survival of Adult and Larval Stages of Gelatinous Zooplankton. *PLoS ONE*, v.8, n.10, e74476, 2013.

AMERICAN PETROLEUM INSTITUTE. *Guide for assessing and remediating petroleum hydrocarbons in soils*. Washington: API, 1993. 59 p.

AMERICAN PETROLEUM INSTITUTE. *Oil Spills in U.S. Waters*. Washington: API, 1998. 59 p.

AMERICAN PETROLEUM INSTITUTE. *Fate of spilled oil in marine waters: where does it go? What does it do? How do dispersants affected it?* Washington: API, 1999. 59 p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *NBR 12.713: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia* spp (Crustacea, Cladocera)*. 2009.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *NBR 15.469: Ecotoxicologia aquática - Preservação e preparo de amostras*. 2007.

BAIRD, C. *Química ambiental*. 2. ed. Porto Alegre: Ed. Bookman, 2002.

BANERJEE, S.; YALKOWSKY, S.H. Cosolvent-induced solubilization of hydrophobic compounds into water. *Analytical Chemistry*, v. 60, p. 2153-2155, 1988.

BARATA, C.; CALBET, A.; SAIZ, E.; ORTIZ, L.; BAYONA, J.M. Predicting single and mixture toxicity of petrogenic polycyclic aromatic hydrocarbons to the copepod *Oithona davisae*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 24, n. 11, p. 2992-2999, 2005.

BARNES, R.D. *Zoologia de invertebrados*. 4. ed. São Paulo: Editora Rocca, 1984.

BARRON, M.G.; PODRABSKY T.; OGLE, S.; RICKER, R.W. Are aromatic hydrocarbons the primary determinant of petroleum toxicity to aquatic organisms? *Aquatic Toxicology*, v. 46, p. 253-268, 1999.

BERROJALBIZ, N.; LACORTE, S.; CALBET, A.; SAIZ, E.; BARATA, C.; DACHS, J. Accumulation and cycling of polycyclic aromatic hydrocarbons in zooplankton. *Environmental Science and Technology*, v. 43, p. 2295–2301, 2009.

BHATTACHARYYA, S.; KLERKS, P.L.; NYMAN, J.A. Toxicity to freshwater organisms from oils and oil spill chemical treatments in laboratory microcosms. *Environmental Pollution*, v. 122, p. 205–215, 2003.

BINELLI, A.; PROVINI, A. The PCB pollution of Lake Iseo (N. Italy) and the role of biomagnification in the pelagic food web. *Chemosphere*, v. 53, p. 143–151. 2003.

BOBRA, A.M.; LING, S.W.; MACKAY, D.; GODMAN, R.U. Acute toxicity of dispersed fresh and weathered crude oil and dispersants to *Daphnia magna*. *Chemosphere*, v. 19, p. 1199-1222, 1989.

BOILLOT, C.; PERRODIN, Y. Joint-action ecotoxicity of binary mixtures of glutaraldehyde and surfactants used in hospitals: use of the Toxicity Index model and isoblogram representation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 71, n. 1, p. 252-259, 2008.

BOUDOU, A.; RIBEYRE, F. Aquatic ecotoxicology: From the ecosystem to the cellular and molecular levels. *Environmental Health Perspectives*, v. 105, p. 21-35, 1997.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 18 mar. 2005, p. 58-63

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução 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. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 16 mai. 2011, p. 89.

BRASIL. Lei nº 9.478, de 06 de agosto de 1997. Dispõe sobre a política energética nacional, as atividades relativas ao monopólio do petróleo, institui o Conselho Nacional de Política Energética e a Agência Nacional do Petróleo e dá outras

providências. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 07 ago. 1997. p. 16925.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 2914 de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 14 dez.2011. Seção 1, p. 39-46.

BRAUNER, C.J.; BALLANTYNE, C.L.; VIJAYAN, M.M.; VAL, A.L. Crude oil exposure affects air-breathing frequency, blood phosphate levels and ion regulation in an air-breathing teleost fish, *Hoplosternum littorale*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 123C, p. 127-134, 1999.

BUIKEMA, A.L.; SHERBERGER, S.R. *Daphnia*. *Carolina Biological Supply Company*, v. 15, n. 10, 1977.

BURATINI, S.V.; BERTOLETTI, E.; ZAGATTO, P.A. Evaluation of *Daphnia similis* as a Test Species in Ecotoxicological Assays. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 73, p. 878–882, 2004.

BUTT, J.A.; DUCKWORTH, D.F.; PERRY, S.G. *Characterization of Spilled Oil Samples: Purpose, Sampling, Analysis and Interpretation*. 1.ed. England: John Wiley and Sons, 1986.

CAIRNS, J. *Biological Monitoring in Water Pollution*. 1. ed. Califórnia: Pergamon Press, 1982.

CAIRNS, J.; VAN DER SCHALIE, W.H. Biological monitoring, part I - Early warning systems. *Water Research*, v. 14, p. 1179–1196, 1980.

CANTON, J.H.; GREVE, P.A.; SCOOF, W.; VAN ESCH, G.J. Toxicity, accumulation, and elimination studies of 3-hexachlorocyclohexane (6-HCH) with freshwater organisms of different trophic levels. *Water Research*, v. 9, p. 1163-1169, 1975.

CHOVANEC, A.; HOFER, R.; SCHIEMER, F. Fish as bioindicators. 2003. Separata de: MARKERT, B.A.; BREURE, A.M.; ZECHMEISTER, H.G. (Eds). *Bioindicators and biomonitoring: Principles, Concepts, and Applications*. Oxford: Elsevier, 2003, p. 639-676.

CHRISTENSEN, J.S.; ELTON, J. Groundwater Pollution Primer. Soil and Groundwater Pollution from BTEX. Civil engineering Dept – Virginia Tech, 1996. Disponível em: <<http://ewr.cee.vt.edu/environmental/teach/gwprimer/btex/btex.html>>. Acesso em: 10 set. 2013.

CHUKWUAND, L.O.; OKHUMALE, B.O. Mode of joint action response to binary mixtures of three refined petroleum products by Nile tilapia *Oreochromis niloticus* fingerlings. *Scientific Research and Essays*, v. 4, p. 806-811, 2009.

COMPANHIA ESTADUAL DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO BÁSICO E DE DEFESA DO MEIO AMBIENTE. *Aplicação de microrganismos e culturas celulares na avaliação da toxicidade de efluentes industriais na região da grande São Paulo*. São Paulo: CETESB, 1987. 146 p.

COMPANHIA ESTADUAL DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO BÁSICO E DE DEFESA DO MEIO AMBIENTE. *Relação de áreas contaminadas e reabilitadas no Estado de São Paulo*. São Paulo: CETESB, 2012. 14 p.

CORSEUIL, H.X.; ALVAREZ, P.J.J. Implications of the presence of ethanol on intrinsic bioremediation of BTX plumes in Brazil. *Hazardous Materials*, v. 13, n. 2, p. 213-221, 1996.

CORSEUIL, H.X., MARINS, M.D.M. Contaminação de Águas Subterrâneas por Derramamentos de Gasolina: O Problema É Grave? *Revista Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 2, n. 2, p. 50-54, 1997.

CORSEUIL, H. X.; KAIPPER, B.I.A.; FERNANDES, M. Cosolvency effect in subsurface systems contaminated with petroleum hydrocarbons and ethanol. *Water Research*, v. 38, p. 1449-1456, 2004.

COSTA, C.R.; OLIVI, P.; BOTTA, C.M.R.; ESPINDOLA, E.L.G. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. *Química Nova*, v. 31, n. 7, p. 1821-1831, 2008.

CROSBY D.G.; TUCKER R.K. Accumulation of DDT by *Daphnia Magna*. *Environmental Science and Technology*, v. 5, p. 714-716, 1971.

CRUZ, M.J.F.; CARVALHO, F.R.; STRAGEVITCH, L. Efeito de aditivos oxigenados na pressão de vapor de gasolinas. In: 2º CROGRESSO BRASILEIRO DE P&D EM PETRÓLEO E GÁS. Rio de Janeiro. *Anais do 2º Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo & Gás*, 2003.

D'ISEP, M.S.P.; DA COSTA, T.C.; MATSUMOTO, S.T.; DA SILVA, A.B.; SIQUEIRA, L.; ADDAD, J.E. Avaliação ecotoxicológica de amostras ambientais contaminadas com combustíveis derivados de petróleo, após atendimento emergencial, por meio do teste com *Vibrio fischeri*. In: X CONGRESSO BRASILEIRO DE ECOTOXICOLOGIA, Rio Grande do Sul, 2008. p.110.

DAVISON, W; FRANKLIN, C.E.; MCKENZIE, J.C.; CAREY, P.W. The effects of chronic exposure to the water soluble fraction of fuel oil on an Antarctic fish *Pagothenia borchgrevinki*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 104, p. 67-70, 1993.

DI TORO, D.M.; MCGRATH, J.A; STUBBLEFIELD, W.A. Predicting the toxicity of neat and weathered crude oil: toxic potential and the toxicity of saturated mixtures. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 26, p. 24-36, 2007.

DOUGLAS, G.S.; OWENS, E.H.; HARDENSTINE, J.; PRINCE, R.C. The Ossa II Pipelina Oil Spill: the character and weathering of the spilled oil. *Spill Science & Technology Bulletin*, v. 7, n. 3-4, p. 135-148, 2002.

DUARTE, K.S. *Avaliação do Risco Relacionado à Contaminação dos Solos por Hidrocarbonetos no Distrito Federal*. 2003. 284 f. Tese (Doutorado em Geotecnia) - Departamento de Engenharia Civil e Ambiental, Universidade de Brasília. Brasília, 2003.

EBERT, D. *Ecology, Epidemiology, and Evolution of Parasitism in Daphnia*. Bethesda: National Center for Biotechnology Information, 2005. E-book.

ESCHER, B.I.; BEHRA, R.; EGGEN, R.I.L.; FENT, K. Molecular mechanisms in ecotoxicology: an interplay between environmental chemistry and biology. *Chimia*, v. 51, p. 915-921, 1997.

FATORELLI, L. *Proposta de Avaliação de Risco Ecológico para Contaminações de Petróleo e Derivados - Estudo de Caso*. 2005. 102 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Departamento de Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

FELIX, F.F.; NAVICKIENE, S.; DÓREA, H.S. Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs) como indicadores da qualidade dos solos. *Revista da Fapese*, v. 3, n. 2, p. 39-62, 2007.

FENT, K. Ecotoxicological problems associated with contaminated sites. *Toxicology Letters*, v. 140-141, p. 353-365, 2003.

FERNANDES, M. *Influência do etanol na solubilidade de hidrocarbonetos monoaromáticos em aquíferos contaminados por gasolina*. 1997. 115 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1997.

FERNANDES, M.; CORSEUIL, H.X. Atenuação natural de hidrocarbonetos em um aquífero contaminado com gasolina com etanol. In: 21º CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, Rio de Janeiro, 2001, p. 1-10.

FERNANDES, M.; CORSEUIL, H.X. Contaminação de Águas Subterrâneas por Derramamento de Gasolina: Efeito Cossolvência. In: 3º SIMPÓSIO ÍTALO-BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL (SIBESA), Gramado, 1996.

FERREIRA, S. M. *Relação entre a Espessura Real e Aparente da Gasolina com Etanol e da Gasolina Pura em Colunas de Laboratório*. 2003. 119 f. Tese (Doutorado em Recursos Minerais e Hidrogeologia) - Instituto de Geociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

GALASSI, S.; MINGAZZINI, M.; VIGANO, L.; CESARCO, D.; TOSATO, M.L. Approaches to modeling toxic responses of aquatic organisms to aromatic hydrocarbons. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 16, p. 158-169, 1988.

GEIGER, J.G.; BUIKEMA, A.L. Hydrocarbons Depress Growth and Reproduction of *Daphnia pulex* (Cladocera). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, v. 39, n. 6, p. 830-836, 1982.

GILBERT, R.O. *Statistical Methods for Environmental Pollution Monitoring*. 1.ed. New York: Van Nostrand Reinhold Co., 1987.

GILDE, K.; PINCKNEY, J.L. Sublethal Effects of Crude Oil on the Community Structure of Estuarine Phytoplankton. *Estuaries and Coasts*, v. 35, n. 3, p. 853-861, 2012.

GONZÁLEZ, J.J.; VIÑAS L.; FRANCO, M.A.; FUMEGA, J.; SORIANO J.A.; GRUEIRO, G.; MUNIATEGUI, S.; LÓPEZ-MAHÍA, P; PRADA, D., BAYONA, J.M.; ALZAGA, R.; ALBAIGÉS, J. Spatial and temporal distribution of dissolved/dispersed aromatic hydrocarbons in seawater in the area affected by the Prestige oil spill. *Marine Pollution Bulletin*, v. 53, p. 250–259, 2006.

GOVERNOR'S ETHANOL COALITION. The fate and transport of ethanol-blended gasoline in the environment. A literature review and transport modeling. Nebraska, 1999. 103 p.

GRAY, J.S. Biomagnification in marine systems: The perspective of an ecologist. *Marine Pollution Bulletin*, v. 45, p. 46–52, 2002.

GREEN J.; TRETT, M. *The fate and effects of oil in Freshwater*. 1.ed. London: Elsevier Applied Science, 1989.

HAMILTON, M.A.; RUSSO, R.C.; THURSTON, R.V. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environmental Science & Technology*, v. 11, n. 7, p. 714-719, 1977.

HEATH, J.S.; KOBLIS, K.; SAGER, S.L. Review of chemical, physical, and toxicologic properties of components of Total Petroleum Hydrocarbons. *Journal of Soil Contamination*, v. 2, n. 1, p. 1-25, 1993.

HERBES, S.E; RISI, G.F. Metabolic alteration and excretion of anthracene by *Daphnia pulex*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 19, p. 147-155, 1978.

HERMENS, J.L.; HERINGA, M.B.; LAAK, T.L. Bioavailability in dose and exposure assessment of organic contaminants in (eco)toxicology. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, v. 70, n. 9, p. 727-30, 2007.

HERNANDO, M.D.; EJERHOON, M.; FERNANDEZ-ALBA, A.R.; CHISTI, Y. Combined toxicity effects of MTBE and pesticides measured with *Vibrio fischeri* and *Daphnia magna* bioassays. *Water Research*, v. 37, p. 4091-4098, 2003.

HIURA, T.S.; KASZUBOWSKI, M.P.; LI, N.; NEL, A.E. Chemicals in diesel exhaust particles generate oxygen radicals and induce apoptosis in macrophages. *Journal of Immunology*, v. 163, p. 5582-5591, 1999.

HOLT, M.S. Sources of chemical contaminants and routes into the freshwater environment. *Food and Chemical Toxicology*, v. 38, p. 21-27, 2000.

IHARA, P.M. Aplicação de ensaios ecotoxicológicos com diferentes organismos-teste na determinação da toxicidade da água produzida. 2008. 90 f. Dissertação (Mestrado em Oceanografia Física, Química e Geológica) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2008.

INSTITUTO ESTADUAL DO AMBIENTE. Gerenciamento de áreas contaminadas do Estado do Rio de Janeiro: Cadastro de áreas contaminadas e reabilitadas – 1ª ed. Rio de Janeiro: INEA, 2013. 10 p.

INTERNACIONAL ENERGY AGENCY. World energy outlook 2013 factsheet – How will global energy markets evolve to 2035? IEA, 2013. 5 p.

INTERNATIONAL OIL AND GAS PRODUCERS ASSOCIATION. *Aromatics in produced water: occurrence, fate, effects, and treatment*. OGP, 2002. Report No. I.20/324, 30p.

INTERNATIONAL OIL AND GAS PRODUCERS ASSOCIATION. *Fate and effects of naturally occurring substances in produced water on the marine environment*. OGP, 2005, Report No. 364, 42p.

JIANG, Z.; HUANG, Y.; XU, X.; LIAO, Y.; SHOU, L.; LIU, J.; CHEN, Q.; ZENG, J. Advance in the toxic effects of petroleum water accommodated fraction on marine plankton. *Acta Ecologia Sinica*, v. 30, p. 8–15, 2010.

KAIPPER, B.I.A. *Influência do etanol na solubilidade de hidrocarbonetos do óleo diesel em aquíferos contaminados por petróleo*. 2003. 199 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

KATSUMITI, A.; VALDEZ DOMINGOS, F. X.; AZEVEDO, M.; DA SILVA, M. D.; DAMIAN, R. C.; ALMEIDA, M. I. M.; SILVA DE ASSIS, H. C.; CESTARI, M. M.; RANDI M, A. F.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; FREIRE, C. A. An assessment of acute biomarker responses in the demersal catfish *Cathorops spixii* after the Vicuña Oil Spill in a harbour estuarine area in Southern Brazil. *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 152, p. 209-222, 2009.

KHAN, N.; WARITH, M.A.; LUK, G. A comparison of acute toxicity of biodiesel, biodiesel blends, and diesel on aquatic organisms. *Journal of the Air and Waste Management*, v. 53, n. 3, p. 286-296, 2007.

KODO FILHO, A.K. Uso de biomarcadores de contaminação ambiental na avaliação do impacto do vazamento de óleo derivado de petróleo em ecossistemas de água doce. 2006. 95 f. Dissertação (Pós-Graduação em Ecologia e Conservação) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

KOYAMA, J.; KAKUNO, A. Toxicity of heavy fuel oil, dispersant, and oil-dispersant mixtures to a marine fish, *Pagrus major*. *Fisheries Science*, v. 70, p. 587-594, 2004.

KULKAMP; M.S. *Atenuação natural de hidrocarbonetos de petróleo em um aquífero com derramamento simultâneo de diesel e etanol*. 2003. 134 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

LABORATÓRIO DE SIMULAÇÃO NUMÉRICA EM MECÂNICA DOS FLUIDOS E TRANSFERÊNCIA DE CALOR (SINMEC). Modelo de análise de risco para locais contaminados com Hidrocarbonetos de petróleo e álcool. Disponível em: <http://www.sinmec.ufsc.br/sinmec/lab/jonas/modelo_hc.html>. Acesso em: 25 nov. 2013.

LASDAY, A.H.; MARTENS, E.W. Fate of oil and effects on marine life. *Journal of Petroleum Technology*, v. 28, p. 1285–1288, 1976.

LEE, R.F. Processes affecting the fate of oil in the sea. 1980. Separata de: GEYER, R.A. (Ed.). *Marine Environmental Pollution, I. Hydrocarbons*. Amsterdam: Elsevier, 1980. p. 337-351.

LEE, W.J.; WINTERS, K.; NICOL, J.A.C. The biological effects of the water-soluble fractions of a N° 2 fuel oil on the planktonic shrimp, *Lucifer faxoni*. *Environmental Pollution*, v. 15, n. 3, p. 167-183, 1978.

MACKAY, D.; McAULIFFE, C.D. Fate of hydrocarbons discharged at sea. *Oil and Chemical Pollution*, v. 5, n. 1, p. 1-20, 1988.

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

MARCHINI, S.M.; HOGLUND, D.; BRODERIUS, S.J.; TOSATO, M.L. Comparison of the susceptibility of daphnids and fish to benzene derivatives. *Science Total Environmental* (Suplem), p. 799-808, 1993.

MARKERT, B. Quality assurance of plant sampling and storage, 1995. Separata de: QUEVAUVILLE, P.P. (Ed.). *Quality Assurance in Environmental Monitoring: Sampling and Sample Pretreatment*. Weinheim: VCH-publisher, 1995, p. 223-252.

MARKERT, B.; WAPPELHORST, O.; WECKERT, V.; HERPIN, U.; SIEWERS, U.; FRIESE, K. The use of bioindicators for monitoring the heavy-metal status of the environment. *Journal of Radioanalytical Nuclear Chemistry*, v. 240, n. 2, p. 425-429, 1999.

MARKING, L.L. Method for assessing additive toxicity of chemical mixtures. 1977. Separata de: MAYER, F.L.; HAMELINK, J.L. (Eds.). *Aquatic toxicology and hazard evaluation*. Philadelphia: American Society for Testing and Materials, 1977. p. 99-118.

MARTÍNEZ-GÓMEZ, C.; VETHAAK, A.D.; HYLLAND, K.; BURGEOT, T.; KÖHLER, A.; LYONS, B.P.; THAIN, J.; GUBBINS, M.J.; DAVIES, I.M. A guide to toxicity assessment and monitoring effects at lower levels of biological organization following marine oil spills in European waters. *Journal of Marine Science*, v. 67, p. 1105-1118, 2010.

MARTÍNEZ-JERÓNIMO, F.; VILLASEÑOR, R.; RÍOS, G.; ESPINOSA-CHAVEZ, F. Toxicity of the crude oil water-soluble fraction and kaolin-adsorbed crude oil on *Daphnia magna* (Crustacea: Anomopoda). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 48, n. 4, p. 444-449, 2005.

MIKHAYLOVA, L.V. Peculiarities of behavior of water-soluble crude oil fractions in model experiments. *Vodniye Resursy*, v. 2, p. 125-134, 1986.

MILANI, E.J.; BRANDÃO, J.A.S.L.; ZALÁN, P.V.; GAMBOA, L.A.P. Petróleo na margem continental brasileira: geologia, exploração, resultados e perspectivas. *Revista Brasileira de Geofísica*, v. 18, n. 3, p. 351-396, 2000.

MILLEMANN, R.E.; BIRGE, W.J.; BLACK, J.A.; CUSHMAN, R.M.; DANIELS, K.L.; FRANCO, P.J.; GIDDINGS, J.M.; MCCARTHY J.F; STEWART, A.J. Comparative acute toxicity of aquatic organisms of components of coal-derived synthetic fuels. *Transactions of the American Fisheries Society*, v.113, p. 74-85, 1984.

MILLER, A. *Remediação de fase livre de gasolina por bombeamento duplo: estudo de caso – São Paulo*. 2001. 133 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Geociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

MÜLLER, J.B. *Avaliação da toxicidade da fração solúvel em água do biodiesel, diesel e da mistura binária diesel/biodiesel de 5% (B5)*. 2011. 112f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

MUÑOZ, M.J.; TARAZONA, J.V. Synergistic Effect of Two- and Four-Component Combinations of the Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Phenanthrene, Anthracene, Naphthalene and Acenaphthene on *Daphnia magna*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 50, n. 3, p. 363-368, 1993.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. *Committee on Oil in the Sea: Inputs, Fates, and Effects*. NRC, Washington, 2003. 280 p.

NEFF, J.M.; OSTAZESKI, S.; GARDINER, W.; STEJSKAL, I. Effects of weathering on the toxicity of three offshore Australian crude oils and a diesel fuel to marine animals. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 19, n. 7, p. 1809-1821, 2000.

NERO, V.; FARWELL, A.; LISTER, A.; VAN DER KRAAK, G.; LEE, L.E.J.; VAN MEER, T.; MACKINNON, M.D.; DIXON, D.G. Gill and liver histopathological changes in yellow perch (*Perca flavescens*) and goldfish (*Carassius auratus*) exposed to oil sands process-affected water. *Ecotoxicology Environmental Safety*, v. 63, p. 365-377, 2006.

NIEDERLEHNER, B.R.; CAIRNS, J.; SMITH, E.P. Modeling acute and chronic toxicity of nonpolar narcotic chemicals and mixtures to *Ceriodaphnia dubia*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. v. 39, p. 136-146, 1998.

OLIVEIRA, E. *Contaminação de aquíferos por hidrocarbonetos provenientes de vazamentos de tanques de armazenamento subterrâneo*. 1992. 112 f. Dissertação (Mestrado em Geociências) – Instituto de Geociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1992.

OLIVEIRA, E. O etanol é um contaminante? *Revista Meio Ambiente Industrial*, v. 26, p. 94-95, 2000.

PAIXÃO, J.F.; NASCIMENTO, I.A.; PEREIRA, S.A.; LEITE, M.B.L.; CARVALHO G.C; SILVEIRA JR. J.S.C.; REBOUÇAS, M.; MATIAS, G.R.A.; RODRIGUES, I.L.P. Estimating the gasoline components and formulations toxicity to microalgae (*Tetraselmis chuii*) and oyster (*Crassostrea rhizophorae*) embryos: An approach to minimize environmental pollution risk. *Environmental Research*, v. 103, p. 365-374, 2007.

PARVEZ, S.; VENKATARAMAN, C.; MUKHERJI, S. Nature and Prevalence of Non-Additive Toxic Effects in Industrially Relevant Mixtures of Organic Chemicals. *Chemosphere*, v. 75, p. 1429-1439, 2009.

PASSINO-READER, D.R.; HICKEY, J.P.; OGILVIE, L.M. Toxicity to *Daphnia pulex* and QSAR Predictions for Polycyclic Hydrocarbons Representative of Great Lakes Contaminants. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 59, n. 5, p. 834-840, 1997.

PELLETIER, E.; SARGIAN, P.; PAYET, J.; DEMERS, S. UV effects on aquatic and coastal ecosystems ecotoxicological effects of combined UVB and organic contaminants in coastal waters: a review. *Photochemistry and Photobiology*, v. 82, p. 981-993, 2006.

PENNER, G. C. *Estudos laboratoriais da contaminação do solo por gasolina com o uso de detector de fotoionização: hidráulica e saneamento*. 2000. 109 f. Dissertação (Mestrado em Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2000.

PEPPER, I.; GERBA, C.E; BRUSSEAU, M. *Pollution Science*. 1. Ed. San Diego: Academic Press, 1996.

PISONI, M.; COGOTZI, L.; FRIGERI, A.; CORSI, I.; BONACCI, S.; IACOCCA, A., LANCINI, L.; MASTROTOTARO, F.; FOCARDI, S.; SVELTO, M. DNA adducts, benzo[a]pyrene monooxygenase activity, and lysosomal membrane stability in *Mytilus galloprovincialis* from different areas in Taranto coastal waters (Italy). *Environmental Research*, v. 96, p.163-175, 2004.

PONT, G.D. *Toxicidade do óleo diesel para o peixe Astyanax altiparanae*. 2012. 112 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Departamento de Zootecnia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

PRESTES, E.B.; JONSSON, C.M.; CASTRO, V.L.S.S. Avaliação da toxicidade aguda de piraclostrobin, epoxiconazol e sua mistura em *Daphnia similis*. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, v. 22, p. 43-50, 2012.

RAND, G.M.; WELLS, P.G.; McCARTY, L.S. Introduction to aquatic toxicology. 1995. Separata de: RAND, G.M. (Ed.). *Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate and Risk Assessment*. Washington, D.C.: Taylor & Francis, 1995, p. 3-67.

RANJBAR, M.; JAAFARZADEH, N; PIRI, M.; KHODADADY, M. Survey of Methyl Tertiary Butyl Ether (MTBE) toxicity using bioassay on *Daphnia magna*. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, v. 10, n. 3, p. 541-545, 2011.

RATTE, H.T.; HAMMERS-WIRTZ, M.; CLEUVERS, M. Ecotoxicity testing. 2003. Separata de: MARKERT, B.A.; BREURE, A.M.; ZECHMEISTER, H.G. (Eds.). *Bioindicators and biomonitors: Principles, Concepts, and Applications*. Oxford: Elsevier, 2003, p. 221-258.

RATUSHNYAK, A.A.; ANDREEVA, M.G.; LATYPOVA, V.Z.; SHAGIDULLIN, R.R.; TRUSHIN, M.V. Toxicity of Oil and Products of its Refinement to *Daphnia magna*: Time and Temperature Dependences. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, v. 5, n. 4, p. 545-549, 2009.

RODRIGUES, R.V.; MIRANDA-FILHO, K.C.; GUSMÃO, E.P.; MOREIRA, C.B.; ROMANO, L.A.; SAMPAIO, L.A. Deleterious effects of water-soluble fraction of petroleum, diesel and gasoline on marine pejerrey *Odontesthes argentinensis* larvae. *Science of the Total Environment*, v. 408, p. 2054-2059, 2010.

ROMERO-LOPEZ, J.; LOPEZ-RODAS, V.; COSTAS, E. Estimating the capability of microalgae to physiological acclimatization and genetic adaptation to petroleum and diesel oil contamination. *Aquatic toxicology*, v. 124, p. 227-237, 2012.

RUPPERT, E.; BARNES, R.D. *Zoologia dos Invertebrados*. 6. ed. São Paulo: Editora Rocca, 1996.

SAIZ, E.; MOVILLA, J.; YEBRA, L.; BARATA, C.; CALBET, A. Lethal and sublethal effects of naphthalene and 1,2-dimethylnaphthalene on naupliar and adult stages of the marine cyclopoid copepod *Oithona davisae*. *Environmental Pollution*, v. 157, p. 1219-1226, 2009.

SANDRES, G.C. *Contaminação dos solos e águas subterrâneas provocada por vazamentos de gasolina nos postos de combustíveis devido à corrosão em tanques enterrados*. 2004. 147f. Dissertação (Mestrado Profissional em Sistemas de Gestão) - Departamento de Engenharia de Produção, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2004.

SCHLENK D.; PERKINS, E.J.; HAMILTON, G.; ZHANG, Y.S., LAYHER, W. Correlation of hepatic biomarkers with whole animal and population-community metrics. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, v. 53, p. 2299–2309, 1996.

SHEEHAN, J. P. Effects of pollutants on community and ecosystem structure and dynamics. 1984. Separata de: SHAHEEN, J. P.; MILLER, D. R.; BUTLER, G. C.; BOURDEAU, P. (Eds.). *Effects Of Pollutants At The Ecosystem Levels*. New York: John Wiley Sons Ltd., 1984. p. 51-99.

SINDERMAN, C.J. *Ocean pollution: Effects on living resources and humans*. 1. ed. Boca Raton: CRC Press, 1996.

SOUTHWORTH, G.R.; BEAUCHAMP, J.J.; SCHMIEDER, P.K. Bioaccumulation potential of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Daphnia pulex*. *Water Research*, v. 12, p. 973-977, 1978.

STEGEMAN, J.J.; HAHN, M.E. Biochemistry and molecular biology of monooxygenases: Current directions in forms, functions, and regulation of cytochrome P450 in aquatic species. 1994. Separata de: MALINS, D.C.; OSTRANDER, G.K. (Eds.). *Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives*, CRC/Lewis, 1994, p. 87-206.

STEEN, A.; FRITZ, D.E.; STUBBLEFIELD, W.; GIDDINGS, J. Environmental Effects of Freshwater Oil Spills. *International Oil Spill Conference Proceedings*, v. 1999, n. 1, p. 607-612, 1999.

TATEM, H.E.; COX, B.A.; ANDERSON, J.W. The Toxicity of Oils and Petroleum Hydrocarbons to Estuarine Crustaceans. *Estuarine and Coastal Marine Science*, v. 6, p. 365-373, 1978.

THE INTERNATIONAL TANKER OWNERS POLLUTION FEDERATION. *Fate of marine spills*. ITOPF, 2011. 11p.

THOMPSON, A.S.; RHODES, J.C.; PETTMAN, I. *Culture collection of algae and protozoa: catalogue of strains*. 5. ed. Cumbria: Freshwater Biological Association, 1988.

TOSATO, M.L.; PINO, A.; PASSERINI, L.; MARCHINI, S.M.; VIGANO, L.; HOGLUND, M. Updating and validation of a daphnia toxicity model for benzene derivates. *Science of the Total Environment*, v. 134, n. 2, p. 1479-1490, 1993.

TRUCCO, R.G.; ENGELHARDT, F.R.; STACEY, B. Toxicity, Accumulation and Clearance of Aromatic Hydrocarbons in *Daphnia pulex*. *Environmental Pollution*, v. 31, p. 191-202. 1983.

UNITED STATES ENVIRONMENT PROTECTION AGENCY. *Ambient water quality criteria for benzene*. USEPA, 1980. 125 p.

UNITED STATES ENVIRONMENT PROTECTION AGENCY. *Great Lakes Dredged Material Testing and Evaluation Manual*. USEPA, 1998. 73 p.

UNITED STATES ENVIRONMENT PROTECTION AGENCY. *Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms*. USEPA, 2002. 275 p.

VAN DER OOST, R., BEYER, J.; VERMEULEN, N. Fish bioaccumulations and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 13, p. 57-149, 2003.

VARZACACOU, N.N. Interação de gasolina, benzeno, tolueno e xilenos com argilominerais esmectíticos da Formação Resende, Bacia de São Paulo. 2009. 108 f. Dissertação (Mestrado em Geoquímica e Geotectônica) – Instituto de Geociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

VERA, G.; TAM, J.; PINTO, E. Efectos ecotoxicológicos del petróleo crudo, diesel y kerosene sobre el crecimiento poblacional de la microalga *Chaetoceros gracilis* Schutt. *Ecología Aplicada*, v. 8, n. 1, p. 1-7, 2009.

VERNIER, P. DNA adducts detection in mussels exposed to bulkyaromatic compounds in laboratory and field conditions. Separata de: GARRIGUES, P.; BARTH, H.; WALKER, C.H.; NARBONNE, J.F (Eds). *Biomarkers in marine organisms: a practical approach*. Amsterdam: Elsevier, 2001.p. 65-84.

WALKER, C.H.; HOPKINS, S.P.; SIBLY, R.M.; PEAKALL, D.B. *Principles of Ecotoxicology*. 3. ed. London: Taylor & Francis, 1996.

WALKER, D.; MICHEL, K.; COLEMAN, J.C.; MICHEL, J. Oil in the sea: changes in the nature of sources and inputs since 1985. *International Oil Spill Conference Proceedings*, v. 2003, n.1, p. 669-673, 2003.

WELTENS, R.; GOOSSENS C.R.; PUymbroEck, S.V. Ecotoxicity of contaminated suspended solids for filter feeders (*Daphnia magna*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 39, p. 315-323, 2000.

WINTER, K., DANIEL, R.O.; BATTERLON, J.C.; VAN BALLON, C. Water Soluble components of four fine oils chemical characterization and effects on growth of water plants. *Marine Biology*, v. 36, p. 269-276, 1976.

WOOTTEN, F.C. *Toxicological monitoring and protocol development for abandoned pipeline removal in Louisiana*. 2009. 118 f. Dissertação (Master of Science) - Louisiana State University. 2009.

YANG, S.Z.; JIN, H.J.; WEI, Z.; HE, R.X.; JI, Y.J.; LI, X.M.; YU, S.P. Bioremediation of oil spills in cold environments: a review. *Pedosphere*, v. 19, p. 371-381, 2009.

ZAGATTO P.A.; BERTOLETTI, E. *Ecotoxicologia Aquática – princípios e aplicações*. 2.ed. São Carlos: Editora Rima, 2008.

ZAGATTO, P.A. *Evaluation ecotoxicologique du reservoir Guarapiranga, SP, Bresil, en relation avec le problème des algues toxiques et des algicides*. 1995. 86 f. Tese (Doutorado em Toxicologia Ambiental) - Université de Metz, France, 1995.

ZIOLLI, R.L. *Fotodegradação da fração solúvel em águas do mar sob ação da luz solar*. 1999. 110 f. Tese (Doutorado em química) - Departamento de Química Analítica, Unicamp, Campinas, 1999.