

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL

SILVIA MARA HALUCH BERTON

**ESTUDO DA TOXICIDADE DE HIDROCARBONETOS  
MONOAROMATICOS UTILIZANDO *Vibrio fischeri*, *Daphnia magna* e  
*Desmodesmus subspicatus***

DISSERTAÇÃO

CURITIBA  
2013

SILVIA MARA HALUCH BERTON

**ESTUDO DA TOXICIDADE DE HIDROCARBONETOS  
MONOAROMATICOS UTILIZANDO *Vibrio fischeri*, *Daphnia magna* e  
*Desmodesmus subspicatus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR como requisito parcial para a obtenção do título de “Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental”.

Área de concentração: Tecnologias e Processos Ambientais.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Josmaria Lopes de Moraes

CURITIBA

2013

---

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

---

- B547 Berton, Silvia Mara Haluch**  
Estudo da toxicidade de hidrocarbonetos monoaromáticos utilizando *Vibrio fischeri*, *Daphnia magna* e *Desmodesmus subspicatus* / Silvia Mara Haluch Berton. – 2013.  
158 f. : il. ; 30 cm
- Orientador: Josmaria Lopes de Moraes.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Curitiba, 2013.  
Bibliografia: f. 120-137.
1. Benzeno. 2. Tolueno. 3. Compostos aromáticos. 4. Hidrocarbonetos. 5. Toxicidade – Testes. 6. Toxicologia ambiental. 7. Tecnologia ambiental – Dissertações. I. Moraes, Josmaria Lopes de, orient. II. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental. III. Título.

CDD (22. ed.) 363.7

# TERMO DE APROVAÇÃO

**SILVIA MARA HALUCH BERTON**

ESTUDO DA TOXICIDADE DE HIDROCARBONETOS MONOAROMATICOS  
UTILIZANDO *Vibrio fischeri*, *Daphnia magna* e *Desmodesmus subspicatus*

Dissertação aprovada como requisito para a obtenção do grau de mestre no programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:

Orientadora:

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Josmaria Lopes de Moraes  
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR

Membro:

---

Prof. Dr. Fábio Kummrow  
Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP  
Câmpus DIADEMA

Membro:

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marlene Soares  
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR

Curitiba, 25 de fevereiro de 2013.

- *Documento assinado está arquivado na UTFPR.*

*Dedico este trabalho a todos  
aqueles que estavam presentes  
em toda jornada em busca dessa  
vitória.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus.

Agradeço à minha querida filha Flávia Caroline Haluch Berton e meu querido esposo Flávio Berton.

Agradeço a orientação da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Josmaria Lopes de Moraes, minha guia e amiga.

Agradeço aos professores do PPGCTA – UTFPR.

Agradeço ao Prof. Dr. Fabio Kummrow que aceitou a participar da banca de avaliação deste trabalho.

Agradeço a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marlene Soares, sempre presente em várias fases de minha vida e aceitando a participar da banca de avaliação deste trabalho.

Agradeço ao Laboratório de Análises Ambientais TECLAB Ltda pelo apoio financeiro, instrumental e técnico durante o período de realização deste trabalho.

Agradeço à minha família e a segunda família TECLAB.

Agradeço aos amigos pelo constante apoio para a finalização desse estudo.

## RESUMO

BERTON, Silvia M. Haluch. **Estudo da toxicidade de hidrocarbonetos monoaromáticos utilizando *Vibrio fischeri*, *Daphnia magna* e *Desmodesmus subspicatus***. 2013. 153 f. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Os hidrocarbonetos monoaromáticos BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos) têm sido utilizados como solventes e estão presentes no ambiente, incluindo o ar, solo e água. Entre os componentes mais tóxicos estão o benzeno e o tolueno. Para uma correta avaliação do efeito desses contaminantes em águas é imprescindível a realização de estudos ecotoxicológicos. O objetivo deste trabalho foi estudar a toxicidade aguda e crônica dos hidrocarbonetos monoaromáticos por BTEX sobre os organismos testes *Daphnia magna*, *Vibrio fischeri*, *Desmodesmus subspicatus* e comparar os resultados com os limites definidos pelas legislações. Foram preparadas soluções aquosas em presença de metanol empregando-se padrões de BTEX-Mix, benzeno e tolueno (isolados). Essas soluções foram empregadas nos testes de ecotoxicidade conduzidos de acordo com metodologias padronizadas pela ABNT. Os resultados mostraram que para os testes com *Daphnia magna* os valores de CE50(48h) para BTEX-Mix, benzeno e tolueno foram, respectivamente, 1.187,27  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , 73,23  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , 81,58  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . Os testes com *Desmodesmus subspicatus* não apresentaram sensibilidade para o BTEX-Mix até 1000  $\mu\text{g.L}^{-1}$  e foram obtidos os valores de CI(96h) para benzeno e tolueno, respectivamente, 197,90  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , 7.270  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . Com relação à utilização de metodologias padronizadas foi verificado que os ensaios com *Daphnia magna* apresentaram maior reprodutibilidade. Os resultados dos ensaios com *Vibrio fischeri* não apresentaram reprodutibilidade principalmente devido à volatilização das amostras. Comparações realizadas entre os valores das legislações e os resultados obtidos nos testes permitiram afirmar que, na maioria dos casos, os valores máximos permitidos estão abaixo do CE50 encontrado no estudo. Para descarte de efluentes em corpo receptor são preocupantes os valores estipulados quando o corpo receptor não possui grande capacidade de assimilar as altas cargas dos monoaromáticos. Para a Portaria 2914/2011 de consumo de água, o valor de 170  $\mu\text{g.L}^{-1}$  está acima do CE50 e do CE10 encontrado para *Daphnia magna*, enquanto para a dessedentação de animais conforme o CONAMA 396/08 está abaixo. Os valores internacionais ambientais coincidem e estão abaixo dos valores encontrados, já as referências no Brasil para avaliação de passivos estão acima.

**Palavras-chave:** BTEX. Benzeno. Tolueno. Testes de Ecotoxicidade.

## ABSTRACT

BERTON, Silvia M. Haluch. **Study of the toxicity of monoaromatic hydrocarbons using *Vibrio fischeri*, *Daphnia magna* and *Desmodesmus subspicatus***. 2013. 153 p. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

The hydrocarbons monoaromatic BTEX (benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes) have been used as solvents and are present in the environment, including air, soil and water. Among the most toxic components are benzene and toluene. For a correct evaluation of the effect of these contaminants in water is essential to carry out ecotoxicological studies. The objective of this work was to study the acute and chronic toxicity of monoaromatic hydrocarbons BTEX represented by tests on organisms *Daphnia magna*, *Vibrio fischeri*, *Desmodesmus subspicatus* and compare with the current laws. Aqueous solutions were prepared in the presence of methanol from patterns of BTEX-Mix, benzene, and toluene (isolated). These solutions were used to ecotoxicity tests according to standard procedures by ABNT. The results showed that in tests with *Daphnia magna* EC50 values (48h) for BTEX (mix), benzene and toluene were respectively  $1187.27 \mu\text{gL}^{-1}$ ,  $73.23 \mu\text{gL}^{-1}$ ,  $81.58 \mu\text{gL}^{-1}$ . Tests with *Desmodesmus subspicatus* showed no sensitivity to the BTEX (mix) until  $1000 \mu\text{gL}^{-1}$  were obtained and the values of CI (96h) for benzene and toluene, respectively,  $197.90 \mu\text{gL}^{-1}$ ,  $7,270 \mu\text{gL}^{-1}$ . With respect to the use of standardized methodologies been found that *Daphnia magna* assays showed higher reproducibility. The results of tests with *Vibrio fischeri* showed no reproducibility principally due to volatilization of the samples. Comparisons between the values of laws and the results obtained in tests enabled state that in most cases the maximum allowed values are below the EC50 found in the study. For disposal of effluent in the receiving body are disturbing the values stipulated when the receiver does not have great body ability to absorb the high loads of monoaromatic. For Ordinance number 2914/2011 of water amounts to  $170 \mu\text{gL}^{-1}$ . It is above the EC50 and EC10 found for *Daphnia magna*, while for tooth loss of animals as CONAMA 396/08 is below. The international environmental values coincide and are below the values found in the references already in Brazil for evaluation of liabilities are above.

**Keywords:** BTEX. Benzene. Toluene. Ecotoxicity tests.

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Valores de massa molecular, densidade específica, pressão de vapor, constante de Henry, solubilidade em água, coeficiente de partição octanol água (Log K <sub>ow</sub> ) de benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (para, orto e meta). ....	23
Quadro 2 - Parâmetros físico e químico dos compostos da gasolina.....	24
Quadro 3 - Valores de referência de monoaromáticos para toxicologia ocupacional. ....	26
Quadro 4 - Classificação de Hodge e Sterner conforme a toxicidade. ....	26
Quadro 5 – Lista das principais legislações nacionais relacionadas a valores dos componentes em estudo. ....	42
Quadro 6 - Legislações e limites estabelecidos para fins de monitoramento ambiental de ecotoxicidade. ....	43
Quadro 7 - Valores máximos permitidos do CONAMA 357 de 17 de março de 2005 para águas doces, salinas e salobras, classes 1 e 2. ....	45
Quadro 8 - Valores de referência CONAMA 396/2008 que subdivide a água em usos preponderantes: consumo humano, dessedentação de animais, irrigação e recreação. ....	46
Quadro 9 - Valores orientadores citados no Anexo III da Resolução CONAMA 420 de 28 de dezembro de 2009.....	46
Quadro 10 - Valores do CONAMA 430 DE 13 DE MAIO DE 2011, padrões para lançamento de efluentes. ....	47
Quadro 11 – Valores de BTEX da PORTARIA N. 2914 de 12 de dezembro 2011, referência para água de consumo humano. ....	48
Quadro 12 – Valores para benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos estabelecidos pelo Decreto 1190. ....	48
Quadro 13 - Portaria IAP N. 19 de 10 de fevereiro de 2006 - Tabela de Limites Máximos de Toxicidade Aguda para <i>Daphnia magna</i> , <i>Vibrio fischeri</i> e <i>Desmodesmus subspicatus</i> .....	49
Quadro 14 - Resolução SEMA nº. 21 – 04 de julho de 2011.....	50
Quadro 15 - Valores de referência CESTEB 195-2005 – E, 23 de novembro de 2005 para BTEX.....	50

Quadro 16 - Valores citados na Portaria N.017 de 18 de abril de 2002. Limites Máximos de Toxicidade Aguda para os microcrustáceos - <i>Daphnia magna</i> (Straus, 1820) e para as bactérias bioluminescentes - <i>Vibrio fischeri</i> , dos efluentes de diferentes categorias. ....	51
Quadro 17 – Valores de referência para compostos aromáticos (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos) apresentados na Lista Holandesa 6530-3, para águas considerando um solo com teor de argila e matéria orgânica de 0%. Valores em concentração em peso seco ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ ). ....	52
Quadro 18- valores de referência para compostos aromáticos (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos) apresentados na Lista Holandesa 6530-3, para águas considerando um solo com teor de argila de 25 % e 10% de matéria orgânica. Valores em concentração em peso seco ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ ). ....	52
Quadro 19- Valores de referência internacional para BTEX em águas. ....	53
Quadro 20- Estudos científicos sobre toxicidade do benzeno. ....	55
Quadro 21 - Estudos científicos sobre toxicidade do Etilbenzeno. ....	56
Quadro 22 – Estudos científicos sobre toxicidade do Tolueno. ....	56
Quadro 23- Estudos científicos sobre toxicidade do xileno. ....	57
Quadro 24 – Ensaio e metodologias empregados nos estudos de toxicidade. ....	61
Quadro 25 - Quadro resumo de Valores de Referência de diversas normas relacionados com hidrocarbonetos monoaromáticos .....	92

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química e identificação (CAS) dos hidrocarbonetos aromáticos benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos. FONTE: MERCK (2007) .....	22
Figura 2 - Microcrustáceo <i>Daphnia magna</i> com 22-24h de vida com aproximadamente 1 mm de comprimento (esquerda) e com 38 dias (direita) com aproximadamente 5 mm de comprimento. Observações em Microscopia óptica com aumento de 40X. ....	32
Figura 3 – A: foto tubo de ensaio contendo bactéria luminescente ( <i>Vibrio fischeri</i> ) ..	33
Figura 4 - <i>Desmodesmus subspicatus</i> .....	35
Figura 5 – Foto de cultivo de alga .....	35
Figura 6 – Curvas de concentração-resposta (efeito agudo e crônico). ....	36
Figura 7 - Modelo de carta controle.....	39
Figura 8 – Fluxograma dos testes agudos e crônicos com <i>Daphnia magna</i> , <i>Vibrio fischeri</i> e <i>Desmodesmus subspicatus</i> expostos aos hidrocarbonetos aromáticos. ..	60
Figura 9 - Cromatógrafo HP 5890 série II (esquerda) e processo de injeção de amostra no cromatógrafo (direita). ....	64
Figura 10 – Exemplo de Cromatograma (CG/FID) onde os picos estão representados na sequência 1 – metanol (tempo de retenção 1,3 minutos), 2- benzeno (tempo de retenção 4,9 minutos), 3- tolueno (tempo de retenção 8 minutos), 4-etilbenzeno (tempo de retenção 10,4 minutos), 5 - <i>m,p</i> xilenos (tempo de retenção 10,8 minutos) e 6 <i>o</i> -xileno (tempo de retenção 11,1 minutos) .....	65
Figura 11 - Equipamento Cromatógrafo Agilent Technologies 7890A – G3430A.....	66
Figura 12 - Cromatograma (CG/MS) onde os picos estão representados na sequência 1 – metanol, 2- benzeno,3- tolueno, 4-etilbenzeno, 5 - <i>m,p</i> xilenos e 6- <i>o</i> -xileno.....	67
Figura 13 - Foto da área cultivo dos cladóceros empregados ( <i>Daphnia magna</i> ). ....	68
Figura 14 - Meio de cultivo em aeração de cultivos de <i>D. subspicatus</i> utilizadas como alimento para <i>Daphnia magna</i> . ....	68
Figura 15 – Fluxograma da sequência de preparação da cultura de <i>V.fischeri</i> .....	71
Figura 16 - (A) Solução de reconstituição para cepa congelada. (B) Ependorf contendo a bactéria congelada. (C) cepa em meio ágar-ágar.....	71
Figura 17 - Foto de amostras (ensaio com <i>Vibrio fischeri</i> ) sendo colocadas nas cubetas do termobloco a 15° C. ....	72

Figura 18 – Foto do Equipamento Lumistox® Dr Lange. ....	72
Figura 19 – Gráfico de valores de clorofila x densidade de células algáceas. ....	74
Figura 21 – Agitador orbital com as amostras para Ensaio com a alga <i>Desmodesmus subspicatus</i> . ....	76
Figura 22 - Foto fluorímetro durante uso para o ensaio. ....	76
Figura 23 – Carta de sensibilidade de <i>Daphnia magna</i> empregando dicromato de potássio. ....	82
Figura 24 - Curva de concentração - resposta do ensaio de toxicidade aguda (48h) com <i>Daphnia magna</i> para solução aquosa contendo BTEX teste preliminar com concentrações de de 25, 50, 75, 100, 150, 200, 400, 1000 e 1500 µg.L <sup>-1</sup> ....	84
Figura 25 - Curva de concentração – resposta do ensaio de toxicidade aguda (48h) com <i>Daphnia magna</i> para solução aquosa de benzeno em metanol (concentrações de 50, 70, 100, 150 e 250 µg.L <sup>-1</sup> ).....	87
Figura 26 - Curva de concentração – resposta do ensaio de toxicidade aguda (48h) com <i>Daphnia magna</i> para solução aquosa de tolueno em metanol (concentrações de 50, 60, 70, 80, 100 e 250 µg.L <sup>-1</sup> ).....	89
Figura 27 – À esquerda 25-A: foto do microcrustáceo <i>Daphnia magna</i> após exposição ao benzeno, microscópio aumento 40x; à direita 25-B: foto de um espécime de <i>Daphnia magna</i> em período fértil sem a exposição de benzeno, microscópio aumento 40x.....	96
Figura 28 - Foto de Vários espécimes de <i>Daphnia</i> após acréscimo de benzeno na água de cultivo, microscópio aumento 40X .....	97
Figura 29 – Carta de sensibilidade de <i>Vibrio fischeri</i> empregando sulfato de zinco..	98
Figura 30 - Curva de concentração - resposta do teste definitivo de toxicidade de <i>V. fischeri</i> frente à BTEX.....	101
Figura 31 - Curva concentração - resposta teste preliminar de toxicidade de <i>V. fischeri</i> frente ao benzeno. ....	103
Figura 32 – Representação dos valores obtidos para os testes com benzeno empregando bactéria <i>Vibrio fischeri</i> . ....	104
Figura 33 - Curva concentração - resposta de toxicidade de <i>V. fischeri</i> frente ao tolueno.....	105
Figura 34 – Carta de sensibilidade para a alga <i>Desmodesmus subspicatus</i> utilizando sulfato de cobre como substância de referência. ....	106

Figura 35 – Erlenmeyer e Becker utilizados para os testes com <i>Desmodesmus subspicatus</i> (esquerda) e <i>Daphnia magna</i> (direita). Em A e B estão indicados espaços sem amostra onde pode ocorrer “headspace” .....	108
Figura 36- Representação gráfica concentração - resposta do benzeno em teste com <i>Desmodesmus subspicatus</i> .....	109
Figura 37- Representação gráfica concentração - resposta do Tolueno.....	111

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentrações preparadas para os testes de volatilização e testes de toxicidade aguda. Testes realizados em duplicata. ....	62
Tabela 2 - Concentrações preparada para os testes de volatilização e testes de toxicidade crônica. Testes realizados em triplicata. ....	63
Tabela 3 - Condições cromatográficas para determinação de BTEX via CG FID. ....	64
Tabela 4 - Condições cromatográficas para determinação de BTEX via CG MS/MS .....	66
Tabela 5 – Solução nutriente preparada a partir da solução estoque de meios.....	75
Tabela 6 – Valores de área cromatográfica relacionada com concentrações de BTEX-Mix e de metanol em soluções aquosas. ....	80
Tabela 7 - Valores de área cromatográfica relacionada com concentrações de benzeno, tolueno e metanol em soluções aquosas.....	81
Tabela 8 – Resultados de determinações de concentração de solução aquosa de BTEX-Mix em metanol. Valores iniciais e após 48h em condições semelhantes ao teste com <i>D.magna</i> .....	83
Tabela 9 - Resultados de determinações de concentrações de solução aquosa de benzeno em metanol. Valores iniciais e após 48h em condições semelhantes ao teste com <i>D.magna</i> . ....	83
Tabela 10 - Resultados de determinações de concentrações de solução aquosa de tolueno em metanol. Valores iniciais e após 48h em condições semelhantes ao teste com <i>D.magna</i> . ....	83
Tabela 11 – Valores obtidos com teste de toxicidade da <i>Daphnia magna</i> frente à BTEX.....	85
Tabela 12 - Dados obtidos com teste preliminar de toxicidade da <i>Daphnia magna</i> frente ao benzeno. ....	86
Tabela 13 - Dados obtidos com teste final de <i>Daphnia magna</i> com benzeno.....	87
Tabela 14 – Valores obtidos do teste de toxicidade da <i>Daphnia magna</i> frente ao tolueno.....	88
Tabela 15 – Valores obtidos do teste final de toxicidade da <i>Daphnia magna</i> frente ao tolueno.....	89
Tabela 16 – Valores de CE50 obtidos dos testes de BTEX, benzeno e tolueno dos testes realizados com <i>Daphnia magna</i> .....	91

Tabela 17 - Resultados do teste de acumulação de benzeno com <i>Daphnia magna</i> .	96
Tabela 18 - Valores obtidos no teste de volatilização de soluções de BTEX-mix nas condições teste de <i>Vibrio fischeri</i> (30 minutos).	99
Tabela 19 – Valores obtidos com o teste de volatilização de solução aquosa de benzeno em metanol e de solução aquosa de tolueno em metanol nas condições dos testes com <i>Vibrio fischeri</i> .	99
Tabela 20 - Dados obtidos com teste preliminar de toxicidade de <i>V. fischeri</i> frente à BTEX.	100
Tabela 21 - Dados obtidos com teste definitivo de toxicidade de <i>V. fischeri</i> frente à BTEX.	101
Tabela 22- Valores de CE50 de BTEX dos testes 1 e 2 com <i>V. fisheri</i> .	102
Tabela 23– Teste preliminar empregando <i>Vibrio fischeri</i> para determinar curva concentração – resposta do benzeno.	103
Tabela 24 - Dados obtidos com três conjuntos de teste de toxicidade de <i>V. fischeri</i> frente a benzeno.	104
Tabela 25 - Dados obtidos do ensaio preliminar de tolueno com <i>Vibrio fischeri</i> .	105
Tabela 26 - Dados obtidos no segundo ensaio de tolueno com <i>Vibrio fischeri</i> .	105
Tabela 27 – Valores do teste de verificação da volatilidade do tolueno nas condições similares ao teste com <i>Desmodesmus subspicatus</i> .	107
Tabela 28 – Valores dos testes realizados com as soluções de benzeno.	109
Tabela 29– Valores do teste 1 - bioensaio de tolueno com alga <i>D. subspicatus</i> .	110
Tabela 30 - Valores do teste 2 - bioensaio de tolueno com alga <i>D. subspicatus</i> .	111
Tabela 31 - Valores de CE50 obtidos dos testes de BTEX-mix, benzeno e tolueno dos testes realizados com <i>D. subspicatus</i> .	111

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ACGIH	<i>American Conference of Governmental Industrial Hygienists</i>
APHA	<i>American Public Health Association</i>
BTEX	Mistura de Monoaromáticos (Benzeno; Tolueno; Etilbenzeno; <i>o,m</i> Xilenos e <i>p</i> Xilenos)
CE	Concentração Efetiva
CEMA	Conselho Estadual do Meio Ambiente
CENO	Concentração de efeito não observado
CETESB	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
CEO	Concentração de efeito observado
CI	Concentração Inibitória
CIP	Concentração percentual do efeito inibitório
CL	Concentração Letal
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
DL	Dose letal
FD	Fator de diluição
FT	Fator de toxicidade
IAP	Instituto Ambiental do Paraná
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia Qualidade e Tecnologia
PEL	Concentração máxima permitida de contaminantes ocupacional
RBC	Rede Brasileira de calibração.
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
OSHA	<i>Occupational Safety and Health Administration</i>
SEMA	Secretaria Estadual do Meio Ambiente
SM	<i>Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater</i>
TLV-TWA	Concentração média ponderada permitida para uma jornada de 8 horas de trabalho
TLV-STEL	Limite de exposição de curta duração-máxima concentração permitida para um exposição contínua de 15 minutos
USEPA	<i>United States Environmental Protection Agency</i>
VMP	Valor máximo permitido

## LISTA DE ACRÔNIMOS E SÍMBOLOS

FMNH <sub>2</sub>	Flavina Mononucleotídio reduzida
°C	Graus Celsius
CI50	Concentração inibitório de 50% dos organismos testados
CL50	Concentração letal que causa mortalidade de 50% dos organismos testados
CIP	Concentração inibitória porcentual
CEO	Concentração de efeito observado
CENO	Concentração de efeito não observado
µg.L <sup>-1</sup>	Micrograma por litro
mg.L <sup>-1</sup>	Miligrama por litro
ppm	Parte por milhão (Miligrama por litro)
mL.L <sup>-1</sup>	Mililitro por litro
mL	Mililitro
nm	Nanômetro
O <sub>2</sub>	Oxigênio
OD	Oxigênio dissolvido
pH	Potencial hidrogeniônico
K <sub>ow</sub>	Coefficiente de partição octanol-água

# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>20</b>
2.1	OBJETIVO GERAL .....	20
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
<b>3</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	<b>21</b>
3.1	CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL POR SUBSTÂNCIAS ORGÂNICAS .....	21
3.2	HIDROCARBONETOS MONOAROMÁTICOS .....	22
3.2.1	Propriedades dos Hidrocarbonetos Monoaromáticos .....	22
3.2.2	Fontes de Hidrocarbonetos Monoaromáticos.....	24
3.2.3	BTEX e a Saúde Humana .....	25
3.2.4	Efeitos de Interação .....	27
3.2.5	Determinação Analítica de Hidrocarbonetos Monoaromáticos .....	27
3.2.6	Uso de Solventes para Solubilização de Hidrocarbonetos Aromáticos.....	28
3.3	ECOTOXICIDADE .....	29
3.3.1	Microcrustáceo <i>Daphnia magna</i> .....	31
3.3.2	Bactéria <i>Vibrio fischeri</i> .....	33
3.3.3	Alga <i>Desmodesmus subspicatus</i> .....	35
3.3.4	Resultados de Ensaios de Toxicidade .....	36
3.3.5	Principais Métodos Estatísticos para Estimar a Toxicidade .....	38
3.3.6	Sensibilidade e Cartas Controle.....	39
3.4	LEGISLAÇÃO AMBIENTAL PERTINENTE .....	41
3.5	ESTUDOS RELACIONADOS À PRESENÇA E TOXICIDADE DE BTEX...53	
3.6	DADOS DISPONÍVEIS NAS FICHAS DE SEGURANÇA DE PRODUTOS QUÍMICOS (FISPQ) .....	58
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>60</b>
4.1	ESTUDOS PRELIMINARES PARA DETERMINAÇÃO DA TOXICIDADE DE METANOL EM ÁGUA.....	61
4.2	PROCEDIMENTOS PARA PREPARO DAS AMOSTRAS DE BTEX.....	61
4.3	PROCEDIMENTOS PARA PREPARO DAS AMOSTRAS DE BENZENO E TOLUENO .....	62
4.4	ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS .....	63
4.4.1	Cromatografia gasosa – CG/FID.....	63
4.4.2	Cromatografia gasosa – CG MS/MS .....	65
4.5	ENSAIOS DE TOXICIDADE AGUDA EMPREGANDO <i>Daphnia magna</i> .....	67
4.5.1	Cultivo e Manutenção da <i>Daphnia magna</i> .....	67
4.5.2	Ambiente de Cultivo de <i>Daphnia magna</i> .....	68
4.5.3	Procedimentos para a Realização dos Testes com <i>Daphnia magna</i> .....	68
4.5.4	Teste de Sensibilidade para <i>Daphnia magna</i> .....	69
4.5.5	Teste de Volatilização nas Condições do Teste com <i>Daphnia magna</i> .....	69

4.5.6	Teste Exploratório para avaliação do efeito de benzeno não diluído em metanol sobre <i>Daphnia magna</i> .....	70
4.6	ENSAIOS DE TOXICIDADE AGUDA EMPREGANDO <i>Vibrio fischeri</i> .....	70
4.6.1	Cultivo e Manutenção de <i>V. fischeri</i> .....	70
4.6.2	Procedimentos para a Realização dos Testes com <i>Vibrio fischeri</i> .....	71
4.6.3	Teste de sensibilidade para <i>Vibrio fischeri</i> .....	73
4.6.4	Ensaio de Volatilização nas Condições do Teste com <i>Vibrio fischeri</i> .....	73
4.7	ENSAIOS TOXICIDADE CRÔNICA EMPREGANDO <i>Desmodesmus subspicatus</i> .....	73
4.7.1	Manutenção das Microalgas .....	74
4.7.2	Procedimentos para Realização dos Testes com <i>D. subspicatus</i> .....	74
4.7.3	Teste de Sensibilidade para <i>Desmodesmus subspicatus</i> .....	76
4.7.4	Volatilização nas Condições do Teste com <i>Desmodesmus subspicatus</i> .....	76
4.8	GARANTIA DE QUALIDADE .....	76
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>80</b>
5.1	TOXICIDADE DO METANOL.....	80
5.2	PRESENÇA DE METANOL NAS SOLUÇÕES DE BTEX-MIX E NAS SOLUÇÕES PREPARADAS .....	80
5.3	INTERFERENTES NA MATRIZ .....	81
5.4	ENSAIOS EMPREGANDO <i>Daphnia magna</i> .....	81
5.4.1	Carta de Sensibilidade .....	81
5.4.2	Volatilização de Monoaromáticos nas Condições Teste com <i>D. magna</i> .....	83
5.4.3	Ensaio de Toxicidade de Soluções Aquosas do BTEX-Mix em Metanol...84	
5.4.4	Ensaio de Toxicidade de Soluções Aquosas de Benzeno em Metanol .....	86
5.4.5	Ensaio de Toxicidade de Soluções Aquosas do Tolueno em Metanol .....	88
5.4.6	Resultados Obtidos em Comparação aos Valores Citados em Normas .....	90
5.4.7	Estudo Exploratório de benzeno em Espécimes de <i>Daphnia</i> .....	95
5.5	ENSAIOS EMPREGANDO <i>Vibrio fischeri</i> .....	98
5.5.1	Carta de Sensibilidade da Bactéria <i>Vibrio fischeri</i> .....	98
5.5.2	Volatilização de Monoaromáticos nas Condições Teste com <i>V. fischeri</i> .....	99
5.5.3	Ensaio de Toxicidade Aguda de Soluções Aquosas do BTEX-mix em Metanol.....	100
5.5.4	Ensaio de Toxicidade Aguda de Soluções Aquosas do Benzeno em Metanol.....	102
5.5.5	Ensaio de Toxicidade Aguda de Soluções Aquosas do tolueno em Metanol.....	104
5.6	ENSAIOS DE TOXICIDADE CRÔNICA EMPREGANDO <i>Desmodesmus subspicatus</i> .....	106
5.6.1	Carta de Sensibilidade .....	106
5.6.2	Volatilização de Soluções Aquosas de Benzeno e Tolueno em Metanol nas Condições Teste com <i>D. subspicatus</i> .....	107
5.6.3	Ensaio de Toxicidade Crônica de Soluções Aquosas do BTEX-mix em Metanol.....	108
5.6.4	Ensaio de Toxicidade Crônica de Soluções Aquosas do Benzeno em Metanol .....	109
5.6.5	Ensaio de Toxicidade Crônica de Soluções Aquosas do Tolueno em Metanol .....	110
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>113</b>
<b>7</b>	<b>RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>114</b>

<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>115</b>
<b>ANEXO A.....</b>	<b>133</b>
<b>ANEXO B.....</b>	<b>134</b>
<b>ANEXO C.....</b>	<b>135</b>
<b>ANEXO D.....</b>	<b>136</b>
<b>ANEXO E.....</b>	<b>137</b>
<b>ANEXO F.....</b>	<b>138</b>
<b>ANEXO G.....</b>	<b>139</b>
<b>ANEXO H .....</b>	<b>141</b>
<b>APÊNDICE A .....</b>	<b>142</b>
<b>APÊNDICE B1 .....</b>	<b>143</b>
<b>APÊNDICE B2 .....</b>	<b>144</b>
<b>APÊNDICE B3 .....</b>	<b>145</b>
<b>APÊNDICE C .....</b>	<b>146</b>
<b>APÊNDICE D1 .....</b>	<b>147</b>
<b>APÊNDICE D2 .....</b>	<b>148</b>
<b>APÊNDICE D3 .....</b>	<b>149</b>
<b>APÊNDICE D4 .....</b>	<b>150</b>
<b>APÊNDICE D5 .....</b>	<b>151</b>
<b>APÊNDICE E .....</b>	<b>152</b>
<b>APÊNDICE F.....</b>	<b>153</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os produtos derivados do petróleo, que frequentemente impactam o meio ambiente, são formados por uma mistura complexa de compostos orgânicos com predominância de hidrocarbonetos monoaromáticos (PENNER, 2000). Os hidrocarbonetos monoaromáticos de maior preocupação no ambiente são benzeno, tolueno, etilbenzeno e isômeros do xileno (*orto*, *meta* e *para*) (TIBURTIUS, 2004). Esse conjunto de substâncias recebe a denominação de BTEX. Os BTEX são hidrocarbonetos monoaromáticos de baixo peso molecular, moderadamente solúveis em água doce e água do mar e altamente voláteis (NEFF, 2002). São potencialmente impactantes para água, solo e ar e com o agravante de estarem presentes no nosso dia a dia (SILVA *et al.*, 2009).

De acordo com Andrade *et al.* (2012) os impactos ambientais dos BTEX estão relacionados com sua toxicidade, mobilidade e persistência no meio ambiente.

A quantificação desses compostos em diversas matrizes ambientais já está bem estabelecida e o monitoramento tem sido realizado mediante a comparação de dados analíticos com valores de referência ou valores de intervenção previstos nas diversas legislações (HELENO *et al.*, 2010). No entanto, para uma correta avaliação de seu risco ambiental são necessárias comparações desses valores como estudos ecotoxicológicos.

De acordo com Vieira (2004) a bibliografia sobre testes de toxicidade com compostos monoaromáticos presentes nos derivados do petróleo não é vasta, e poucas são as chances de encontrar estudos que relatem a determinação da toxicidade de aromáticos e que possam ser comparativos. A falta de informações toxicológicas sobre um determinado composto, impossibilita a avaliação de risco que os serem humanos ou a biota estão sujeitos em caso de exposição (UMBUZEIRO *et al.*, 2010).

Devido a sensibilidade apresentadas por organismos de diferentes espécies frente às substâncias químicas, é recomendável que o efeito tóxico de uma amostra seja avaliado empregando espécies representativas dos níveis tróficos da cadeia alimentar (COSTA *et al.*, 2008).

De acordo com Vieira (2004) o estudo sobre os efeitos de poluentes no ecossistema como um todo é extremamente complexo e, por vezes, inviável devido a diversos fatores, tais como custos, disponibilidade de tempo, extensão das áreas sob impacto e diversidade das espécies envolvidas.

Nesse sentido, os testes de toxicidade realizados em laboratório são ferramentas importantes para estimar as concentrações nas quais um determinado produto tóxico provoca efeitos deletérios em uma dada população de organismos selecionada.

As legislações atuais consideram diversos valores máximos permitidos desses hidrocarbonetos monoaromáticos, como por exemplo, para consumo de água conforme a Portaria Nº. 2914/2011(BRASIL, 2011), valores de referência para promover a proteção aquática e saúde humana conforme CONAMA 357/2005(BRASIL, 2005) e valores para descarte industrial em corpos receptores conforme CONAMA 430/211(BRASIL, 2011).

Este trabalho também visou apresentar uma contribuição com relação à discussão da realização de testes de toxicidade de hidrocarbonetos monoaromáticos (BTEX-Mix, benzeno, tolueno) utilizando os organismos *Daphnia magna*, *Vibrio fischeri* e *Desmodesmus subspicatus*.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a toxicidade de hidrocarbonetos monoaromáticos (BTEX, benzeno, tolueno) frente a *Daphnia magna*, *Vibrio fischeri* e *Desmodesmus subspicatus* e discutir os resultados obtidos comparando-os com os valores estabelecidos nas legislações ambientais.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Realizar testes de toxicidade com cossolvente metanol com *Daphnia magna*, *Vibrio fischeri* e *Desmodesmus subspicatus*;

Realizar testes de toxicidade aguda de soluções aquosas de BTEX-Mix, benzeno e tolueno para o microcrustáceo *Daphnia magna*;

Realizar testes de toxicidade aguda de soluções aquosas de BTEX-Mix, benzeno e tolueno para a bactéria *Vibrio fischeri*;

Realizar testes de toxicidade crônica de soluções aquosas de BTEX-Mix, benzeno e tolueno para a alga *Desmodesmus subspicatus*;

Comparar os resultados obtidos com os valores estabelecidos nas legislações ambientais.

### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1 CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL POR SUBSTÂNCIAS ORGÂNICAS

A contaminação química do solo, dos aquíferos e das águas superficiais é uma importante questão da atualidade. Derramamentos de contaminantes orgânicos em águas superficiais ou subterrâneas podem resultar na dissolução do poluente e/ou seu espalhamento (FERREIRA, 2010). Uma vez no ambiente, esses poluentes podem apresentar dinâmicas diferenciadas, afetando diversos organismos (VIEIRA, 2004).

A movimentação dos contaminantes na água e no ar e por meio da interface entre diferentes compartimentos é determinada por processos físicos relacionados com as propriedades químicas dos compartimentos ambientais e dos contaminantes. O destino ambiental de contaminantes depende de forma geral, de fatores como seu coeficiente de partição, sua composição e estrutura, tendência à degradação, bioacumulação, fotólise, hidrólise e oxidação, além das condições do ambiente (NEFF, 2002). Substâncias orgânicas com densidade inferior à da água, como os BTEX, formam filmes na coluna d'água dificultando a penetração da luz, reduzindo a fotossíntese e impedindo a oxigenação (AMARANTE, 2002).

Os postos de combustíveis, concentrados nas zonas urbanas, apresentam significativo potencial poluição dos recursos hídricos subterrâneos. A contaminação é gerada pela infiltração de contaminantes derivados de petróleo, principalmente óleo diesel e gasolina (SILVA *et al.*, 2009; FREITAS *et al.*, 2011b). Quando ocorre o derramamento de gasolina em solos, por exemplo, uma das principais preocupações é a contaminação das águas subterrâneas, que também podem contaminar os aquíferos que são usados como fontes de abastecimento de água para o consumo humano (ANDRADE; AUGUSTO; JARDIM, 2012).

No caso de combustíveis como a gasolina e o óleo diesel, os hidrocarbonetos monoaromáticos são os constituintes que têm maior solubilidade em água e, portanto, são os contaminantes com maior potencial de poluir o lençol freático (TIBURTIUS; PERALTA-ZAMORA; LEAL, 2004).

No Brasil o etanol é adicionado à gasolina com o objetivo de melhorar a combustão e em casos de derramamentos, a presença de etanol pode aumentar o impacto de hidrocarbonetos na água subterrânea principalmente devido ao efeito de cossolvência (FERNANDES; CORSEUIL, 2001).

### 3.2 HIDROCARBONETOS MONOAROMÁTICOS

Os hidrocarbonetos monoaromáticos são uma classe de compostos orgânicos formados por um único anel aromático. Os hidrocarbonetos monoaromáticos denominados BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e os isômeros de xileno) estão entre os principais contaminantes das águas (SILVA *et al.*, 2009). A presença destes compostos está comumente associada a deposições atmosféricas, vazamentos de petróleo e derivados e efluentes industriais. Devido à sua alta toxicidade, representa um risco à saúde humana e animal (HELENO *et al.*, 2010).

#### 3.2.1 Propriedades dos Hidrocarbonetos Monoaromáticos

O impacto da presença de BTEX no meio ambiente está relacionado com suas propriedades físicas e químicas e por estarem presentes em quantidades significativas nos diversos compartimentos ambientais (RODRIGUES, 2005).

Na Figura 1 são apresentadas as estruturas químicas do benzeno, tolueno, etilbenzeno e isômeros do xileno.

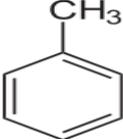
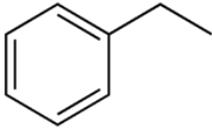
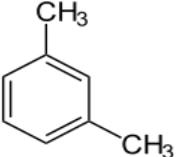
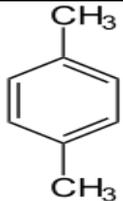
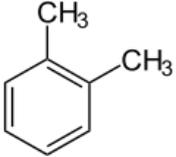
		
Benzeno N. 71-43-2	Tolueno N. 108-88-3	Etilbenzeno N. 100-41-4
		
<i>m</i> -Xileno N. 100-41-4	<i>p</i> -Xileno N. 95-47-6	<i>o</i> -Xileno N. 106-42-3

Figura 1 – Estrutura química e identificação (CAS) dos hidrocarbonetos aromáticos benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos. FONTE: MERCK (2007)

Algumas propriedades físicas e químicas importantes para entender o comportamento ambiental e biológico dos BTEX são listadas (Quadro 1).

Substância	Massa Molecular (g.mol <sup>-1</sup> )	Densidade específica a 20°C(g.cm <sup>-3</sup> )	Pressão de vapor a 20°C (atm)	Constante de Henry K <sub>h</sub>	Solubilidade em água a 25°C (mg.L <sup>-1</sup> )	Log K <sub>ow</sub>
Benzeno	78,10	0,880	0,1250	5500	1780	2,13
Tolueno	92,10	0,867	0,0370	6600	515	2,69
Etilbenzeno	106,10	0,867	0,0125	8700	152	3,13
p-Xileno	106,17	0,860	0,00895	5000	198	2,9-3,2
m-Xileno	106,17	0,864	0,00803	5000	187	2,9-3,2
o-Xileno	106,17	0,887	0,00895	4000	175	2,9-3,2

**Quadro 1 - Valores de massa molecular, densidade específica, pressão de vapor, constante de Henry, solubilidade em água, coeficiente de partição octanol água (Log K<sub>ow</sub>) de benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (para, orto e meta).**

**FONTE: adaptado de TRIGUEIROS (2008); MERCK(2007).**

A volatilidade de um composto pode ser analisada através da sua pressão de vapor, que corresponde à pressão exercida por um vapor sobre seu líquido de origem, ao atingirem o equilíbrio. Assim, quanto maior a pressão de vapor de um líquido, mais volátil ele será. Dentre o grupo do BTEX o composto mais volátil é o benzeno, sendo os xilenos os menos voláteis (BEZERRA, 2012).

O coeficiente partição octanol-água (K<sub>ow</sub>) é definido como a razão da concentração de um composto orgânico dissolvido entre o octanol e a água, em equilíbrio, e descreve a tendência de partição de um composto entre a fase orgânica e a fase aquosa (TRIGUEIRO, 2008). O K<sub>ow</sub> tem se tornado uma importante ferramenta para avaliar o destino dos contaminantes no meio ambiente, assim como para estimar fatores de bioconcentração em organismos aquáticos e toxicidade (TIBURTIUS; PERALTA-ZAMORA; LEAL, 2004; SCHAMBECK, 2012).

Como os compostos químicos orgânicos se acumulam nos lipídios dos organismos, o valor do coeficiente de partição octanol/água gera uma estimativa do seu potencial de bioacumulação e bioconcentração (NEFF, 2002). Além disso, a maior hidrofobicidade do composto também facilita o seu transporte através de membranas biológicas, pelo fato de estas terem constituição lipoprotéica (BURATINI; BRANDELLI, 2008).

Empregando o valor logarítmico de  $K_{ow}$  ( $\text{Log } K_{ow}$ ) o menor coeficiente de partição implica baixa adsorção no solo e maior mobilidade em água (NEFF, 2002). Os BTEX possuem  $\text{Log } K_{ow}$  2,13 a 3,20 indicando uma afinidade moderada para partição em lipídios de tecidos de organismos (NEFF, 2002). Devido às suas propriedades físicas e químicas, BTEX, não são persistentes na água do mar e se complexam ou são adsorvidos fracamente com sedimentos marinhos (NEFF, 2002).

Os hidrocarbonetos monoaromáticos (benzeno, etilbenzeno, tolueno, xileno), que perfazem 10 a 59% da gasolina, são geralmente mais tóxicos que os compostos alifáticos com o mesmo número de carbono ((TIBURTIUS; PERALTA-ZAMORA; LEAL, 2004).

No Quadro 2, podemos verificar diferentes compostos encontrados na gasolina.

Parâmetro e unidade	Benzeno	Tolueno	Etilbenzeno	Xilenos	Nonano	Decano	Dodecano
Massa Molecular ( $\text{g.mol}^{-1}$ )	78,10	92,10	106,10	106,17	128,23	142,29	170,34
Solubilidade em água ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	1780	515	152	198	0,122	0,021	0,005
$\text{Log } K_{ow}$ ( $25^{\circ}\text{C}$ )	2,13	2,69	3,13	2,96 a 3,26	4,67	6,69	7,24

**Quadro 2 - Parâmetros físicos e químicos dos compostos da gasolina.**  
**FONTE: (TIBURTIUS; PERALTA-ZAMORA; LEAL, 2004).**

### 3.2.2 Fontes de Hidrocarbonetos Monoaromáticos

A origem dos compostos BTEX, em geral, está relacionada com as atividades de extração e refino de petróleo e derivados. Também são largamente utilizados em indústrias químicas como matérias-primas para síntese de outros produtos. O benzeno é utilizado na produção de borrachas, plásticos, Nylon, inseticidas e tintas, enquanto que o tolueno é um importante produto químico usado geralmente como um agente de diluição de tintas e como solvente na produção de resinas, colas e óleos (TRIGUEIRO, 2008). O etilbenzeno é usado principalmente na produção do estireno e polímeros sintéticos (TAVARES, 2007).

Os xilenos geralmente são usados como solvente em borrachas e nos processos de tingimento de couro, além de serem utilizados na produção do anidrido ftálico, bactericidas, herbicidas, óleos lubrificantes e ácidos para-ftálico (TAVARES, 2007).

O grupo BTEX também pode ser encontrado em águas superficiais e subterrâneas, em locais contaminados ou em proximidade locais de extração de carvão, petróleo e depósitos de gás (DONAIRE, 2007).

### 3.2.3 BTEX e a Saúde Humana

A poluição causada pelos compostos BTEX é um tópico de grande relevância para a saúde humana. Esses compostos apresentam elevada toxicidade, em geral, relacionada às suas propriedades mutagênicas e carcinogênicas. Além disso, tais compostos aromáticos podem causar distúrbios neurológicos, alterações nas funções do sistema endócrino e lesões em órgãos como os rins e o fígado. De acordo com Rego (1999), a exposição ocupacional a solventes orgânicos pode contribuir no aparecimento dos linfomas e o sinergismo com outros fatores pode constituir um importante aspecto do processo de linfomagênese.

Os BTEX são considerados perigosos por serem potenciais causadores de depressão do sistema nervoso central e leucemia. Gamo *et al.* (2003) organizaram um *ranking* dos 12 maiores poluentes ambientais que ocorrem no Japão. Nesse estudo o benzeno foi classificado como a segunda substância (por ser carcinogênico) e o tolueno como a décima primeira substância em nível de risco para a saúde.

A principal forma de absorção dos BTEX por seres humanos é através da inalação, particularmente por fumar cigarros (FISHBEIN, 1985). Também ocorre essa inalação durante a exposição a vapores enquanto é realizado o abastecimento de veículos em postos de combustíveis. Pela ingestão de alimentos e pelo consumo de água representam uma pequena parcela (MEEK; CHAN, 1994). A inalação de benzeno produz efeitos adversos no sistema nervoso central (AIVALIOTI *et al.*, 2011) e gastrointestinal observado em ratos (GILMAN; GOODMAN; RALL, 1985). A toxicidade do benzeno para os mamíferos é atribuída à hidroquinona e ao anel de “quebra-metabólitos” produzidos no fígado e outros órgãos (HENDERSON, 1995).

O benzeno é um conhecido agente cancerígeno de mamíferos (MEDINSKY *et al.*, 1994). O tolueno tem toxicidade sistêmica moderada a humanos. A inalação de grandes doses de tolueno pode provocar anormalidades de metabolismos como acidose, fraqueza muscular e arritmias cardíacas (HAMILTON; HARDY, 1974).

Os xilenos provocam vasodilatação devido à liberação da histamina e da 5 – hidroxitriptamina, produzindo uma sensação de aquecimento no corpo e avermelhamento da face (TRUJILLO; DANG; STARK, 2003). Segundo ASTDR 1995, *Agency for Toxic Substances and Disease Registry*, aproximadamente 95 % dos isômeros do xilol absorvidos, são eliminados na urina sob a forma de metabólitos.

Os órgãos responsáveis pela proteção da saúde do trabalhador determinaram o valor máximo dos hidrocarbonetos aromáticos em ambiente ocupacional (Quadro 3).

Substância	Portaria MTb 3214 NR 15 – Anexo 11 (mg.L <sup>-1</sup> )	ACGIH TWA-TLV (mg.L <sup>-1</sup> )	ACGIH TLV-STEL (mg.L <sup>-1</sup> )	Outras referências
Benzeno	Ausência	0,50	2,50	OSHA-TWA: 1,00 ppm OSHA-STEL: 5,00 ppm
Tolueno	78	100	150	(EUA, NIOSH):2.000 ppm.
Etilbenzeno	78	100	125	OSHA PEL/TWA: 100 ppm PEL/STEL: 125 ppm
Xilenos	78	100	150	NIOSH 1000 ppm

**Quadro 3 - Valores de referência de monoaromáticos para toxicologia ocupacional.**

**FONTE: BRASIL, 1995; ACGIH, 2001; ACIGH, 2003.**

A Comunidade Européia utiliza a classificação (muito tóxico, tóxico e nocivo) com base na dose letal oral para ratos. No entanto, a classificação mais utilizada ainda é com base nos estudos de Hodge e Sterner (1944) que emprega valores de dose letal (DL50) e apresenta seis categorias (Quadro 4).

Categoria	Administração via oral DL50- ratos (mg.kg <sup>-1</sup> )	Exemplo	Exposição por Inalação CL50 (4 h)-ratos (ppm)	Exemplo
Extremamente tóxica	≤ 1	Fluoracetato de sódio	≤ 50	Ozônio
Altamente tóxica	1 – 50	Fluoreto de sódio	50 -100	Fosfagênio
Moderadamente tóxica	50 – 500	DDT	10-1.000	Formaldeído
Ligeiramente tóxica	0,5 – 4	Acetanilida	1.000 -10.000	Amônia
Praticamente não tóxica	5-15	Acetona	10.000 -100.000	Tolueno
Relativamente atóxica	≥ 15	Glicerol	≥100.000	Freon

**Quadro 4 - Classificação de Hodge e Sterner conforme a toxicidade.**

**Fonte: Hodge; Sterner (1944)**

### 3.2.4 Efeitos de Interação

Na exposição de mais de dois contaminantes, deve-se considerar a possibilidade de um composto interferir na ação do outro. Portanto, numa mistura de agentes tóxicos, pode haver alterações nos efeitos que produziram separadamente. No efeito aditivo o efeito final é igual à soma dos efeitos produzidos separadamente.

No efeito sinérgico o efeito final é maior que a soma dos efeitos individuais. Na potenciação o efeito do xenobiótico é aumentado por interagir com outro toxicante que originalmente não produziria tal efeito tóxico e quando um toxicante reduz o efeito tóxico de outro, observa-se o antagonismo (AZEVEDO, 2003). No antagonismo pode ocorrer a competição entre sítios de ação e o antagonismo químico ocorre reação entre substâncias e por fim não ocorre ação tóxica. (GREGUS; KLAASSEN, 2001).

Esses efeitos de interação entre misturas representam um significativo desafio para a ecotoxicologia. Nesse sentido, a agência NORTE americana de proteção ao meio ambiente elaborou em 1986 o *Guidelines for the Health Risk Assessment of Chemical Mixtures* que estabelece a avaliação de risco para a saúde quando se trata de misturas de produtos químicos (US EPA, 1986).

### 3.2.5 Determinação Analítica de Hidrocarbonetos Monoaromáticos

A quantificação dos compostos monoaromáticos já está consolidada pela química quantitativa através de cromatografia a gás (CG) com detecção por ionização em chama (FID) ou espectrometria de massas (MS).

Diversas técnicas de extração têm sido empregadas para melhorar o limite de quantificação dos BTEX em água, solo, ou em outras matrizes. Dentre elas se destacam a utilização de *headspace* estático e dinâmico, de purga e trapeamento e de microextração em fase sólida com imersão direta da fibra na amostra, ou com os analitos extraídos na fase *headspace* (HELENO *et al.*, 2010).

A técnica da cromatografia, quando associada a um integrador, permite verificar tanto qualitativa quanto quantitativamente à presença de um analito em diferentes amostras (US EPA, 1987).

### 3.2.6 Uso de Solventes para Solubilização de Hidrocarbonetos Aromáticos

Nas últimas décadas, uma série de pesquisas e protocolos reguladores tem dado destaque para avaliação de substâncias solúveis em água. No entanto, quando estes protocolos são utilizados para avaliar as substâncias que são fracamente ou praticamente insolúveis em água, existe a necessidade de se empregar métodos físicos ou químicos para a realizar a solubilização (AMARANTE, 2002).

De acordo com Hutchinson *et al.* (2006) em avaliações de toxicidade deve-se evitar o uso de solventes, buscando o preparo das amostras através da utilização de colunas de saturação ou de outros métodos físicos (por exemplo, agitação ou ultrasom). Em caso de necessidade do uso de solventes é recomendado que a máxima concentração seja de 78,9 mg.L<sup>-1</sup> para etanol e 79,2 mg.L<sup>-1</sup> para metanol (HUTCHINSON *et al.*, 2006).

Em padrões comerciais de BTEX utilizados em laboratórios analíticos, o metanol é o cossolvente principal na grande maioria das marcas disponibilizadas pelos fabricantes.

Okumura *et al.* (2001) realizaram testes de toxicidade empregando cinco solventes orgânicos (metanol, etanol, acetona, N, N-dimetilformamida, DMSO e outros) em nove espécies de microalgas marinhas. A toxicidade dos solventes apresentou valores variáveis de acordo com o organismo teste. Foi possível estabelecer a classificação da toxicidade dos solventes em etanol > metanol ou acetona > DMF > DMSO. Os valores obtidos em relação ao crescimento, para 96h, foram de CENO entre 14 a 10000 mg.L<sup>-1</sup> e 24 a 14000 mg.L<sup>-1</sup> para o etanol e metanol, respectivamente, utilizando diferentes espécies de microalgas marinhas.

Leblanc (1980) realizou vários testes com solventes utilizando etilenoglicol, etanol e acetona. Tartarazako *et al.* (2002) e Calleja; Persone; Geladi (1994) indicam o uso de metanol para solubilizar solventes orgânicos para testes em ecotoxicologia.

No Brasil, é obrigatória a mistura de etanol na gasolina comercializada em todo território nacional no objetivo de aumentar a octanagem da gasolina, diminuindo assim a quantidade de monóxido e dióxido de carbono na atmosfera. Na América do Norte, por exemplo, a adição de etanol na gasolina é em torno de 10% (FREITAS *et al.*, 2011b).

O metanol é usado como matéria-prima para a produção de uma variedade de produtos de consumo (MCKEE *et al.*, 2004). É um líquido incolor, com peso molecular igual a 32,04 e possui um odor suave em temperatura ambiente. Totalmente miscível em água, apresenta a densidade (25°C) de 0,787, pressão de vapor de 160 mmHg a 30°C e Log K<sub>ow</sub> entre -0,82 e -0,68 (MCKEE *et al.*, 2004).

### 3.3 ECOTOXICIDADE

O termo ecotoxicologia foi sugerido pela primeira vez em junho de 1969 durante uma reunião do *Committee of the International Council of Scientific Unions* (ICSU), em Estocolmo, pelo toxicologista francês René Truhaut (TRUHAUT, 1977).

Em 1976 foi definida como “a ciência que estuda os efeitos das substâncias naturais e sintéticas sobre os organismos vivos, populações e comunidades, animais ou vegetais, terrestres ou aquáticos, que consistem na biosfera, incluindo a interação das substâncias com os meios nos quais os organismos vivem num contexto integrado” (PLAA, 1982).

Atualmente os ensaios de toxicidade já estão bem estabelecidos sendo que vários estão padronizados nacional e internacionalmente por associações ou organizações de normalização (ARAGÃO; ARAUJO, 2008). Os testes de toxicidade podem ser classificados em agudos e crônicos. Os testes de toxicidade aguda são utilizados para estimar a dose ou concentração de um agente tóxico que seria capaz de produzir uma resposta específica mensurável em um organismo-teste ou população, em um período de tempo relativamente curto, geralmente de 24 ou 48 h (ARAGÃO; ARAUJO, 2008). Nos testes agudos normalmente as respostas são relacionadas com informações como mortalidade ou imobilização (RATTE *et al.*, 2003).

Testes de toxicidade crônica são realizados para medir os efeitos de substâncias químicas sobre espécies aquáticas por um período que pode abranger parte ou todo o ciclo de vida do organismo-teste (SANTOS *et al.*, 2010). De acordo com Costa *et al.* (2008) Os testes crônicos permitem avaliar os possíveis efeitos tóxicos de substâncias químicas sob condições de exposições prolongadas a concentrações sub-letais, ou seja, concentrações que permitem a sobrevivência dos organismos, mas que afetam suas funções biológicas (tais como reprodução, desenvolvimento de ovos, crescimento e maturação).

De acordo com Knie e Lopes (2004) os testes de toxicidade, quando realizados em laboratórios, também podem ser classificados em estático (sem renovação das soluções teste), semi-estático e dinâmico, de acordo com o método de adição das soluções-teste.

Os critérios para escolher o organismo-teste devem levar em consideração sua representatividade em relação a um determinado grupo de importância ecológica; a facilidade de manutenção em laboratório; sua estabilidade genética (populações uniformes) (RATTE *et al.*, 2003; VIEIRA, 2004). E, de acordo com Ren e Frymier (2003) uma bateria de testes deve incluir organismos de níveis tróficos distintos, de estados crescentes de organização biológica como bactérias, algas, crustáceos e peixes.

Os organismos testes devem ser de fácil manipulação, altamente sensíveis e representativos para a comunidade biótica, porque poucas espécies são testadas como representantes ecológicos. A partir das considerações acima, fica claro que qualquer teste de ecotoxicidade é um compromisso entre praticidade e eficiência de custos de um lado e da representatividade e sensibilidade das espécies investigadas por outro (RATTE *et al.*, 2003).

Rizzo (2011) relaciona como principais ensaios de toxicidade aqueles realizados com invertebrados (*Daphnia magna*, *Daphnia similis*, *Paracentrotus Lividius*, *Artemia salina*), plantas e algas (*Lactuca sativa*, *Desmodemus subspicatus*, *Dunaliella tertiolecta*, *Raphidocelis subcapitata*), microrganismos (*Pseudomonas fluorescens strain* e *Spirillum sp. strain*, *Vibrio fischeri*, bactéria de lodos ativados) e peixes (*Danio rerio*, *Oncorhynchus mykiss*).

Os ensaios de avaliação da genotoxicidade são amplamente empregados em estudos de toxicologia genética de produtos (químicos, farmacêuticos, alimentícios, biológicos e físicos). Genotoxicidade pode ser devido a muitas propriedades físico-químicas, que resultam em agentes de uma vasta variedade de possíveis danos ao material genético (RATTE *et al.*, 2003). O grande desafio em testes de genotoxicidade reside no desenvolvimento de métodos que possam detectar de maneira confiável uma variedade tão grande de danos ou de uma resposta geral celular para alteração provocada pelo agente genotóxico (BLINTON *et al.*, 2008).

### 3.3.1 Microcrustáceo *Daphnia magna*

Os cladóceros são os agentes filtrantes do corpo hídrico (BUKEMA; SHERBERGER, 1977) e em condições ambientais favoráveis reproduzem-se assexuadamente por partenogênese, originando apenas fêmeas geneticamente iguais, o que os torna serem ideais para bioensaios ecotoxicológicos (FREAR; BOYD, 1967).

A *Daphnia magna* STRAUS, 1820 (Cladocera, Crustacea), atua na cadeia alimentar aquática como consumidor primário entre os metazoários. Possuem suas pernas torácicas compostas por cerdas que agem como peneiras, que retêm algas, bactérias e pequenas partículas de material orgânico da água. O alimento é transferido para a boca, onde é moído pelas mandíbulas e direcionado para o trato digestivo (KNIE; LOPES, 2004).

Em laboratórios a alimentação da *Daphnia magna* são algas verdes como *Desmodesmus subspicatus*, *Chlorella* ssp, *Pseudokirchneriella subcapitata* (RATTE et al., 2003).

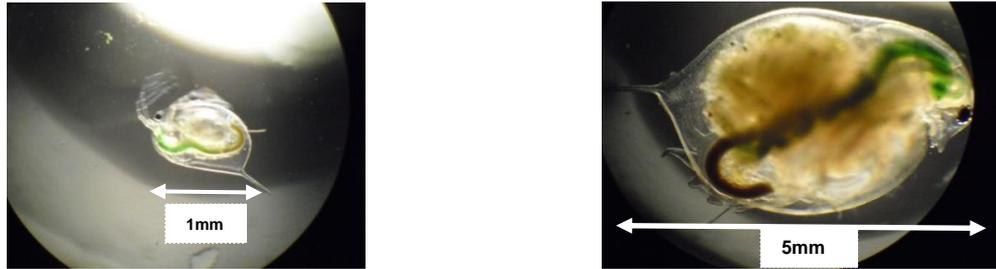
A *Daphnia magna* é vulgarmente conhecida como pulga d'água sendo classificada taxonomicamente no filo Artropoda, subfilo Crustacea, classe Branchiopoda, ordem Diplostraca, subordem Cladocera (RUPPERT; BARNES, 1996). Apresenta tamanho médio de 5 a 6 mm e uma carapaça bivalve transparente que encerra todo o corpo, com exceção da cabeça e antenas (KNIE; LOPES, 2004).

De acordo com Knie e Lopes (2004) o emprego de *Daphnia magna* como organismo teste é devido a: (a) os descendentes são geneticamente idênticos, o que assegura certa uniformidade de respostas nos ensaios; (b) a cultura em laboratório sob condições controladas é fácil e sem grandes dispêndios; (c) o manuseio é simples por causa do tamanho relativamente grande da espécie, em comparação com outros microcrustáceos; (d) o ciclo de vida e de reprodução é suficientemente curto, o que permite também sua aplicação também em testes crônicos.

Além disso, a *Daphnia magna* é relativamente sensível a produtos químicos em comparação com outros invertebrados de água doce (RIZZO, 2011; BAIRD, 2002; RADIX et al., 1999; VERSTEEG et al., 1997).

Os espécimes usados no ensaio devem ser inseridos com menos de 24 h para uso em bioensaios (KNIE e LOPES, 2004). Conforme Ratte *et al.* (2003) a diferença de sensibilidade está relacionada com a idade e com o tempo de exposição .

Na Figura 2 estão apresentados fotos de espécimes de *Daphnia magna* com aproximadamente 24h e com 38 dias.



**Figura 2 - Microcrustáceo *Daphnia magna* com 22-24h de vida com aproximadamente 1 mm de comprimento (esquerda) e com 38 dias (direita) com aproximadamente 5 mm de comprimento. Observações em Microscopia óptica com aumento de 40X.**

**FONTE: Autor**

Os testes com organismos aquáticos foram normalizados e padronizados internacionalmente pela OECD (*Organization for Economic Co-operation and Development*) e pela ISO (*International Organization for Standardization*) e em 2009 a ABNT publicou a NBR 12.713, teste com *Daphnia* spp.

O teste de toxicidade utilizando o microcrustáceo *Daphnia magna* é o bioensaio mais usado internacionalmente para a varredura da toxicidade dos produtos químicos e para o monitoramento da toxicidade de efluentes. Como para todos os testes de toxicidade, os organismos utilizados para o ensaio agudo têm sido obtidos a partir de estoques vivos que são cultivadas em laboratório (PERSONNE *et al.*, 2009).

Para toxicidade aguda, o princípio do método consiste na exposição de indivíduos jovens da *Daphnia magna* por um período de 24 a 48 horas a várias diluições de uma amostra, após o qual é verificado seu efeito sobre a capacidade natatória dos organismos (mobilidade). Para o resultado do ensaio, deve ser registrado o número de indivíduos imóveis em cada solução-teste e, eventualmente, no controle. De acordo com Knie e Lopes (2004) “são considerados imóveis, além dos organismos aparentemente mortos, aqueles incapazes de nadar na coluna d’água até 15 segundos após leve agitação do recipiente”.

### 3.3.2 Bactéria *Vibrio fischeri*

*Vibrio fischeri* (BEIJERINCK, 1889) é uma bactéria marinha luminescente, gram-negativa, anaeróbia facultativa. Em condições favoráveis essa bactéria emite luz naturalmente (figura 3), necessitando para isto oxigênio em concentração acima de  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  (KNIE; LOPES, 2004).

A atividade luminescente microbiana envolve sistemas de transporte de elétrons associados à produção de luz, e que são diretamente afetados por fatores ambientais prejudiciais ao metabolismo celular. Se algum distúrbio sobre a cadeia de transporte de elétrons manifesta-se como uma redução de luz, muito provavelmente a substância tóxica apresenta-se em uma forma biodisponível capaz de penetrar no interior da célula (STEINBERG *et al.*, 1995).

As bactérias luminescentes produzem luz quando simultaneamente oxidam Flavino Mononucleotídeo reduzido ( $\text{FMNH}_2$ ) e um aldeído alifático de cadeia longa (RCHO), na presença de oxigênio e uma enzima do tipo flavina monoxigenase chamada luciferase (SANTOS; SANTOS, 1993). De acordo com White (2009) bioluminescência é a base para vários bioensaios de toxicidade com bactérias luminescentes.



**Figura 3 – A:** foto tubo de ensaio contendo bactéria luminescente (*Vibrio fischeri*)  
**FONTE:** Autor



**Figura 3 – B:** Bactéria *Vibrio fischeri* em vida livre.  
**FONTE:** Copyright 2010 Dennis Kunkel Microscopy, Inc. 2101022C

O teste de toxicidade aguda com *Vibrio fischeri* é considerado uma alternativa valiosa na avaliação da contaminação ambiental. É um método eficiente na detecção da toxicidade de um amplo espectro de contaminantes químicos, especialmente quando se pretende avaliar misturas complexas contendo diferentes compostos orgânicos e inorgânicos (HERNANDO *et al.*, 2006).

De acordo com Girotti *et al.* (2008) essa bactéria é muito utilizada na avaliação de toxicidade aguda por apresentar as vantagens de ser um teste rápido, sensível, reprodutível e com boa relação custo-benefício.

De acordo com Parvez *et al.* (2006) os resultados dos testes apresentam uma boa correlação com outros testes de toxicidade aguda com organismos aquáticos. No entanto, de acordo com Girotti *et al.*(2008), em alguns casos, o sistema de bioluminescência pode não ter sensibilidade suficiente para detectar uma substância tóxica, na sua concentração máxima admissível.

Os ensaios com *Vibrio fischeri* encontraram grande aplicabilidade, especialmente com a padronização em 1991 pelo DIN, norma 38412 parte 34, e em 1998 pela ISO norma 11348, partes 1, 2 e 3 (KNIE; LOPES, 2004).

Em 2006, a ABNT publicou a NBR 15411:2006 - "Ecotoxicologia aquática - Determinação do efeito inibitório de amostras de água sobre a emissão de luz de *Vibrio fischeri* (ensaio de bactéria luminescente)", que, baseada na ISO 11348, emprega o tempo de exposição de 30 minutos, e também é dividida em três partes: Parte 1 - Método utilizando bactérias recém-cultivadas; Parte 2 - Método utilizando bactérias desidratadas; Parte 3 - Método utilizando bactérias liofilizadas.

O sistema analítico é baseado na medição da luminescência emitida pelas bactérias após a exposição a uma amostra por um período de 15 ou 30 min medido através de luminômetro (KNIE e LOPES, 2004).

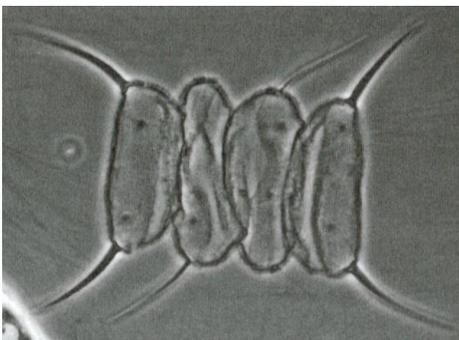
Em virtude de sua origem marinha, para se testar amostras com baixa concentração de sal essas bactérias precisam de ajuste de salinidade, o que é usualmente obtido pela adição de cloreto de sódio (UMBUZEIRO *et al.*, 2010).

### 3.3.3 Alga *Desmodesmus subspicatus*

As algas são um conjunto heterogêneo de organismos que varia em tamanho, de pequenas células individuais a algas gigantes e que pertencem a diferentes linhagens evolutivas. Como resultado, as algas são em grande parte definidas por traços ecológicos e conhecidamente espécies fotossintéticas que produzem oxigênio e vivem em habitats aquáticos. Além disso, não possuem as características morfológicas e reprodutivas das plantas terrestres que representam adaptações vida terrestre. Este conceito das algas protistas fotossintéticas inclui as que são eucariontes conhecidas como algas verdes e as procariontes chamadas de cianobactérias, também conhecidas como algas azuis (GRAHAM; GRAHAM; WILCON, 2009).

Conforme Trainor; Cain; Shubert (1976), *Desmodesmus* gênero que consiste em algas unicelulares, planas, colônias coenobial de 2,4,8 ou 16 células dispostas linearmente e *Scenedesmus* consistia de dois gêneros, um grupo de espécies espinhosas e um grupo de não-espinhosas (KESSLER et al., 1997; VAN HANNEN; FINK; LURLING, 2002.).

*Desmodesmus subspicatus*, HEGEWALD; SCHIMIDT; SCHNEPF; 2000 (Chlorophyta, Chlorophyceae) é uma alga verde planctônica (Figuras 4 e 5), representante dos produtores primários nos ecossistemas de água doce. Nesta função, as algas são à base do ciclo de vida na água, servindo de alimentos para outros organismos; além disso, destaca-se na manutenção do equilíbrio do ambiente aquático, pois participam do ciclo biogeoquímico, especialmente nos ciclos do carbono, oxigênio, nitrogênio, fósforo e silício (KNIE; LOPES, 2004).



**Figura 4 - *Desmodesmus subspicatus*.**  
**FONTE: GRAHAM et al., 2009**



**Figura 5 – Foto de cultivo *D. subspicatus* (conhecida como alga verde).**  
**FONTE: Autor**

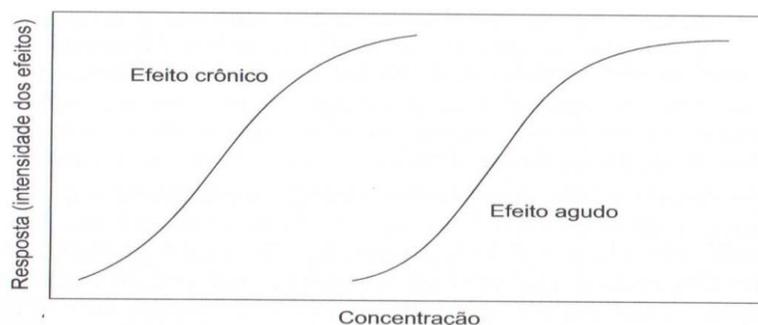
Sicko-Goad e Stoermer (1988); Hellawel (1986) relatam que algas apresentam respostas fisiológicas rápidas provocadas por compostos tóxicos., podendo ser usados como bioindicadores biológicos verificando a qualidade da água e impacto ambiental.

De acordo com Lewis (1990) as algas são mais sensíveis que peixes utilizando substâncias como surfactantes, combustíveis e herbicidas. De acordo com Greene *et al.* (1988), algas têm se mostrado sensíveis a muitos metais e Sosak; Swderska; Maslikowska (1998) considera o teste com alga fundamental devido à importância ecológica que representa esse organismo no ecossistema.

A base da avaliação de testes com algas é a curva de crescimento da população durante 72 ou 96 horas (RATTE *et al.*, 2003).

### 3.3.4 Resultados de Ensaio de Toxicidade

Os resultados dos ensaios de toxicidade podem ser apresentados em gráficos, em que as porcentagens de organismos que exibem respostas específicas são representadas no eixo vertical (variável dependente) e as concentrações de exposição representadas no eixo horizontal (variável independente) (Figura 6).



**Figura 6 – Curvas de concentração-resposta (efeito agudo e crônico).**  
**Fonte: USEPA, 2000**

Nas análises dessas curvas verifica-se que a inclinação é determinada pelo aumento da resposta em função do aumento da concentração. A inclinação informa sobre a toxicidade intrínseca da substância. Inclinação acentuada pode indicar rápida ação ou rápida absorção, significando que pequenas variações levam as diferenças significativas da resposta (BALLANTYNE, 1997).

De acordo com Costa *et al.* (2008) os testes de toxicidade também permitem determinar valores de Dose Letal (DL) Concentração Letal (CL), Concentração Efetiva (CE), Concentração Inibitória (CI) concentração inibitória Percentual (CIP).

A Concentração Efetiva que causa efeito em 50% dos organismos (CE50) representa a concentração nominal da amostra, no início do ensaio, que causa um efeito (imobilidade, redução da luminescência, por exemplo) durante o tempo de exposição (ABNT, 2009).

Geralmente os valores de concentrações efetivas e letais são expressos em relação a 50% dos organismos porque estas respostas são mais reprodutíveis, podendo ser estimadas com maior grau de confiabilidade e são mais significativas para serem extrapoladas para uma população (ARAGÃO; ARAUJO, 2008). É nessa região que ocorre maior linearidade da curva sigmoide concentração-resposta, então o CE50 fica localizado na região média do efeito observável (entre 20 a 80%).

CENO (concentração de efeito não observado) corresponde à maior concentração de agente tóxico que não causa efeito deletério estatisticamente significativo nos organismos no tempo de exposição e nas condições do teste. CEO (concentração de efeito observado) é a menor concentração de agente tóxico que causa efeito deletério estatisticamente significativo nos organismos no tempo de exposição e nas condições do teste.

É importante observar que os valores numéricos de toxicidade aguda e crônica, expressos como CE50, CI50, CIP50, CENO, CEO, CL50 E DL50 exprimem uma relação inversa à toxicidade, ou seja, menores valores numéricos indicam maiores toxicidades.

Para avaliação de efeito agudo são frequentemente empregados resultados que considerem o que ocorre com 50% dos organismos CL50 e a CE50. Para crônicos CI e a CIP. A CI é a concentração inibitória e a CIP é a concentração percentual de efeito inibitório. Esses resultados podem ser determinados através de vários métodos estatísticos (BURATINI; BRANDELLI, 2008).

Os resultados dos ensaios de toxicidade também podem ser expressos em FT (fator de Toxicidade). O FT corresponde à menor diluição da amostra em que não ocorreu efeito em mais de 10% ou 20% dos organismos. O resultado é expresso em número inteiro e é igual ao fator de diluição da solução-teste. Fator de toxicidade é mais empregado para mistura de substâncias e efluentes.

Para *Daphnia magna* a Concentração Efetiva que causa efeito em 50% dos organismos (CE50) representa a concentração nominal da amostra que causa efeito agudo a 50 % dos organismos durante o tempo de exposição e o FT que representa a menor diluição que induz efeito tóxico a 10% de inibição da capacidade natatória (ABNT, 2009).

Para *Vibrio fischeri* a Concentração Efetiva que causa efeito em 50% dos organismos (CE50) representa a concentração nominal da amostra que causa efeito agudo a 50 % dos organismos durante o tempo de exposição e o FT que representa a menor diluição que induz efeito tóxico a 20% de inibição da luminosidade (ABNT, 2006).

Para *Desmodesmus subspicatus* a Concentração inibitória que causa efeito em 50% dos organismos (CI50) representa a concentração nominal da amostra que causa efeito crônico a 50 % dos organismos durante o tempo de exposição e FT que representa a menor diluição que induz efeito tóxico a 20% de inibição do crescimento algáceo (ABNT, 2011).

### 3.3.5 Principais Métodos Estatísticos para Estimar a Toxicidade

Há diversos métodos estatísticos (paramétricos e não paramétricos) para estimar a CE50, CI50 ou a CL50 e o intervalo de confiança associado ao conjunto de ensaios. Esses métodos baseiam-se na transformação dos valores de concentração, visando proporcionar uma relação de concentração-resposta ou dose-resposta que possa ser apresentada por uma equação (USEPA, 2002a).

Os métodos paramétricos mais citados são o método de probitos (USEPA, 2002a), o método de Litchfield–Wilcoxon (LITCHFIELD, WILCOXON, 1949) e o método da função logística (STEPHAN, 1977).

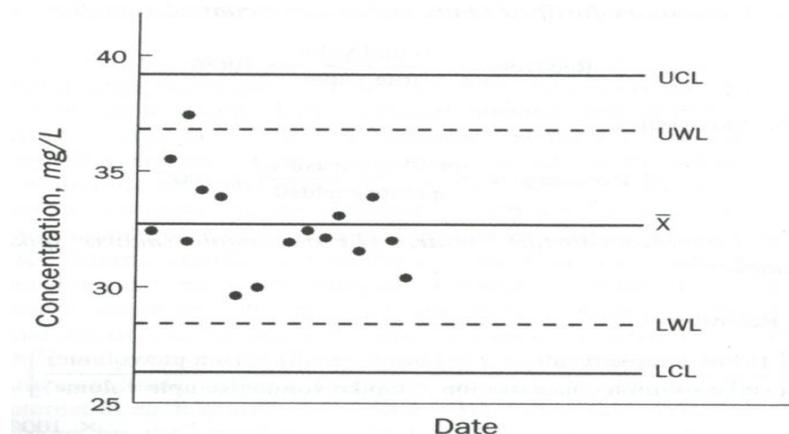
Os métodos não paramétricos são baseados nos efeitos observados sendo o método da interpolação gráfica (US EPA, 2002a), o método da média móvel (Stephan, 1977), o método de Spearman-Kärber e o método de Trimmed Spearman-Kärber (US EPA, 2002a). O método de Probitos, método de Spearman-Kärber e o método de Trimmed Spearman-Kärber foram concebidos para produzir valores de CL50 e CE50 associados a intervalos de confiança de 95%. Muitos desses métodos estão disponíveis em software, dentre os quais o TSK versão 1.5, TOXSTAT, CIP versão 2.0 obtidos na agência USEPA (USEPA, 2002a).

O Método Spearman-Kärber é recomendado quando ocorrem porcentagens de efeito intermediário nas soluções teste, mas os dados não se ajustam ao modelo de probitos (BURATINI; BRNDELLI, 2008). Já o método estatístico Trimmed Spearman-Kärber é um método que alinha os cálculos para 95% de confiança e é o programa ideal para cálculos de CE50, CL50 e DL50 (HAMILTON; RUSSO; THURSTON, 1977).

Para determinação da concentração mais baixa a qual a sobrevivência não é significativamente diferente do controle (NOAEC) é necessário utilizar um teste de hipóteses (US EPA, 2002a). De acordo com Buratini e Brandelli (2008) os testes de hipóteses representam a metodologia mais utilizada devido à simplicidade de cálculos (utilizam ferramentas estatísticas disponíveis em programas computadorizados) e são apropriados a qualquer variável biológica.

### 3.3.6 Sensibilidade e Cartas Controle

Todos os procedimentos relativos ao cultivo dos organismos e a sua manipulação refletem na sua sensibilidade, cuja estabilidade é essencial para a confiabilidade dos resultados dos testes. Por isso, devem ser realizados mensalmente testes de sensibilidade dos organismos de acordo com as normas ABNT (2006; 2009; 2011) e ISO 6341 (1996) e USEPA em forma de carta controle, exemplificada na Figura 7, sendo na variável X as datas de realização dos testes e na variável Y, os valores encontrados de concentração do efeito em estudo.



**Figura 7 - Modelo de carta controle**  
 Fonte: APHA, 2012, figura 1020:I página 1-12

Sendo:

Concentration: concentração

Date: data da realização do teste

UCL : desvio em 2 desvios padrão, superior

UWL: o desvio em 1 desvio padrão, superior

X: média dos valores

LWL: desvio em 1 desvios padrão, inferior

LCL: desvio em 2 desvios padrão, inferior

O resultado de um ensaio de toxicidade é considerado aceitável se a sensibilidade do organismo teste à substância de referência estiver dentro dos limites estabelecidos pela carta-controle, obtida pela média da CIP ou CE50 de um determinado número de ensaios  $\pm 2$  desvios padrão (NIPPER, 2002; ABNT, 2009).

Todos os procedimentos relacionados ao ensaio devem ser reavaliados, quando dois resultados consecutivos estiverem além dos limites definidos na carta de sensibilidade, ou sete resultados consecutivos estiverem de um mesmo lado da linha de tendência central (ABNT, 2009).

Para a *Daphnia magna* a norma ISO 6341 recomenda dicromato de potássio como substância de referência, sendo os valores limites de sensibilidade na faixa de 0,6 a 1,7 mg.L<sup>-1</sup> de CE50 em 24 horas e 0,6 a 0,7 mg.L<sup>-1</sup> de CE50 em 48 horas (KNIE; LOPES, 2004; ISO, 1996).

Para *Vibrio fischeri* de acordo com a norma ISO 11348 quando as bactérias são congeladas e preparadas frescas (preservadas em meio líquido) devem apresentar entre 20 a 80% de inibição de luminescência após 30 minutos de exposição com às seguintes substâncias de referência: 3,5 – diclorofenol: 6 mg.L<sup>-1</sup>; Zn<sup>2+</sup> (como sulfato de zinco hepta-hidratado): 2,2 mg.L<sup>-1</sup>; Cr<sup>6+</sup> (como dicromato de potássio): 4 mg.L<sup>-1</sup>.

Para bactérias liofilizadas, conforme a ISO 11348, são adotados os seguintes valores: 3,5 – diclorofenol: 3,4 mg L<sup>-1</sup>; Zn<sup>2+</sup> (como sulfato de zinco hepta-hidratado): 2,2 mg.L<sup>-1</sup>; Cr<sup>6+</sup> (como dicromato de potássio): 18,7 mg.L<sup>-1</sup>. Para a norma CETESB L5.227 a faixa aceitável de CE50 do sulfato de zinco heptahidratado (ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O), nas condições descritas na norma é 3,0 a 10,0 mg.L<sup>-1</sup>(CETESB, 2001).

Para a *Demodermus subspicatus* a norma ABNT 12.648 indica a utilização de sulfato de cobre como substância de referência mais podem ser escolhidos diversos outros compostos considerando disponibilidade comercial, facilidade de manipulação e menor toxicidade para posterior descarte. Os valores de referência diferem muito entre laboratórios devido a esse uso de diversas substâncias sendo, portanto, a carta controle uma ferramenta importante para verificar a qualidade dos ensaios realizados pelo laboratório.

As algas são sensíveis a íons de metais divalentes (Cu, Cd, Hg, Pb, Zn) que podem reduzir a fotossíntese causando dano estrutural aos cloroplastos (VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004). Várias substâncias são indicadas para serem utilizadas como substância de referência para algas, entre elas sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), sulfato de zinco ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), dodecil sulfato de sódio ( $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaSO}_4$ ) e dicromato de potássio ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) (EPA, 1989).

De acordo com Kramarová *et al.* (2012) para a *D. quadricauda* utilizando metais como substância de referência, a resposta efetiva foi em 29,05 mg.L<sup>-1</sup> com arsênio e 3,65 mg.L<sup>-1</sup> com selênio. De acordo com a Norma ISO 8692 (1989) o valor de inibição para dicromato de potássio deve estar próximo a CIP50 em 3,2 mg.L<sup>-1</sup>.

### 3.4 LEGISLAÇÃO AMBIENTAL PERTINENTE

As legislações ambientais têm abrangência e limites diferenciados em função da autoridade governamental que a instituiu. A Lei nº 9.605, de 12 de fevereiro de 1998 (BRASIL, 1998) que “Dispõe sobre as sanções penais e administrativas derivadas de condutas e atividades lesivas ao meio ambiente [...]”, na Seção III - Da Poluição e outros Crimes Ambientais em seu artigo 54, considera crime ambiental “Causar poluição de qualquer natureza em níveis tais que resultem ou possam resultar em danos à saúde humana ou que provoquem a mortandade de animais ou a destruição significativa da flora”.

Essa Lei estabelece ainda Pena e Multa (Art. 54) Parágrafos 1 e 2.

“§ 1º. Se o crime é culposo: Pena de detenção, de seis meses a um ano, e multa. § 2º. Se o crime estiver relacionado com: [...] “V - lançamento de resíduos sólidos, líquidos ou gasosos, ou detritos, óleos ou substâncias oleosas em desacordo com as exigências estabelecidas em leis ou regulamentos com pena de reclusão de um a cinco anos.”

De acordo com as legislações existe a necessidade de prevenir a contaminação do subsolo e das águas subterrâneas que são bens públicos e reservas estratégicas para o abastecimento público e o desenvolvimento ambientalmente sustentável; a necessidade de estabelecer critérios para definição de valores orientadores para a prevenção da contaminação dos solos e de definir diretrizes para o gerenciamento de áreas contaminadas.

O gerenciamento ambiental tem como principais objetivos de eliminar o perigo ou reduzir o risco à saúde humana; eliminar ou minimizar os riscos ao meio ambiente; evitar danos aos demais bens a proteger; evitar danos ao bem estar público durante a execução de ações para reabilitação; e possibilitar o uso declarado ou futuro da área, observando o planejamento de uso e ocupação do solo.

As Resoluções do CONAMA visam o atendimento as Políticas Nacionais de Gestão Ambiental, de Gestão de Recursos Hídricos e de uso e ocupação do solo, a fim de garantir as funções social, econômica e ambiental como, por exemplo, a SEMA 21/2011 considera a necessidade de dar efetividade ao "princípio da prevenção" consagrado na Política Nacional do Meio Ambiente (artigo 2º, incisos I, IV e IX da Lei Federal N.º 6.938, de 31 de agosto de 1.981).

Para facilitar o acompanhamento da seqüência de dados das legislações atuais, o Quadro 05 apresenta as normativas de valores máximos permitidos dos hidrocarbonetos estudados por ordem cronológica.

Legislação Nacional	
Norma	Interesse
CONAMA 357/05	Estabelece limites para compostos monoaromáticos em diversas classes de água e cita sobre ecotoxicologia.
CONAMA 396/08	Estabelece limites para compostos monoaromáticos para usos preponderantes da água subterrânea.
CONAMA 420/09	Estabelece limites para compostos monoaromáticos para água subterrânea e solos.
CONAMA 430/11	Estabelece limites para compostos monoaromáticos em efluentes de qualquer fonte poluidora para descarte em corpo receptor.
Portaria N. 2914/11	Estabelece limites para compostos monoaromáticos para fins de potabilidade.

**Quadro 5 – Lista das principais legislações nacionais relacionadas a valores dos componentes em estudo.**

No Quadro 06 estão apresentadas lista de legislações relacionadas com ecotoxicologia. Embora as ferramentas legais na forma de leis, decretos, resoluções, portarias e outros instrumentos se constituem nos meios para a efetiva utilização das análises ecotoxicológicas, no Brasil somente a partir da Resolução CONAMA 357/05 (BRASIL, 2005) a questão da toxicidade passou a ser considerada.

<b>Legislação do Estado do Paraná</b>	
Norma	Interesse
Decreto 1190/04	Estabelece limites para compostos monoaromáticos para água subterrânea e solos.
Portaria 19/06	Estabelece limites de ecotoxicidade para fins de monitoramento ambiental.
CEMA 70/09	Estabelece limites de ecotoxicidade para fins de monitoramento ambiental, contribui acrescentado diversos ramos de atividades.
CEMA 81/10	Estabelece limites de ecotoxicidade para fins de monitoramento ambiental, estipulando metas de redução de toxicidade para diversas áreas de atividades.
SEMA 21/11	Estabelece limites de ecotoxicidade para fins de monitoramento ambiental, e valores máximos permitidos de compostos monoaromáticos para solo e água subterrânea.
<b>Legislação do Estado de São Paulo</b>	
Norma	Interese
CETESB/05	Estabelece limites para compostos monoaromáticos para água subterrânea e solos.
<b>Legislação do Estado de Santa Catarina</b>	
Norma	Interesse
FATMA 17/02	Estabelece limites de ecotoxicidade para fins de monitoramento ambiental.
<b>Legislação do Estado de Rio Grande do sul</b>	
Norma	Interesse
CONSEMA/06	Padrões de emissões de efluentes lançados em águas superficiais
<b>Legislação Internacional</b>	
Norma	Interesse
Lista Holandesa 6530	Estabelece limites para compostos monoaromáticos para água subterrânea e solos.
Canadá	CCMTR e CCMTR - Guias de controle ambientais.

**Quadro 6 - Legislações e limites estabelecidos para fins de monitoramento ambiental de ecotoxicidade.**

Com relação à qualidade das águas superficiais, como águas doces (rios, lagos, nascentes e outros), águas salinas e salobras, a Resolução CONAMA 357/05 (BRASIL, 2005) possui alguns padrões descritivos e no Capítulo III, Seção II, torna-se mais explícita a necessidade de uso das avaliações ecotoxicológicas, dependendo da qualidade da água requerida para proteção das comunidades aquáticas.

Nos recursos hídricos de águas doces pertencentes à classe I e II, não pode ser detectado efeito tóxico crônico, enquanto não deve ocorrer efeito tóxico agudo nos recursos hídricos classe III.

A Resolução 357/05 (BRASIL, 2005) fornece o enquadramento dos corpos de águas e cita que as condições de qualidade de águas doces de Classe II:

“não verificação de efeito tóxico crônico a organismos, de acordo com os critérios estabelecidos pelo órgão ambiental competente, ou, na sua ausência, por instituições nacionais ou internacionais renomadas, comprovado pela realização de ensaio ecotoxicológico padronizado ou outro método cientificamente reconhecido “ (BRASIL, 2005).

No entanto, essa exigência de ausência de efeito crônico e agudo está condicionada a critérios estabelecidos pelos órgãos ambientais competentes, o que acaba gerando vários critérios com diferentes graus de exigência.

O CONAMA 357/05 (BRASIL, 2005) classifica as águas disponíveis conforme a qualidade requerida e para os seus usos preponderantes conforme seu artigo 3. Nessa Resolução as águas doces são divididas em classe 1, 2, 3 e 4 e as águas salinas e salobras são divididas em classe especial, classe 1, 2 e 3. No Quadro 08, estão descritos os valores máximos permitidos das classes 1 e 2.

Para as classes de água doce 1, 2 e 3 (CONAMA 357/05) os valores máximos permitidos de benzeno coincidem aos utilizados pelo Ministério da saúde contemplados na Portaria N. 2914/2011, já para tolueno, etilbenzeno e xilenos são mais restritivos no CONAMA 357/05 em relação a água de abastecimento público. Mais não ocorre apenas com os compostos monoaromáticos outros parâmetros legislados são mais restritivos nas classes de água conforme CONAMA em comparado com Portarias de consumo de água.

O valor máximo permitido de tolueno do CONAMA 357/05 é o mesmo recomendado pelo *Canadian Council of Ministers of Environment* - CCME (1995) de  $2 \mu\text{g.L}^{-1}$  demonstrando equivalência normativas de proteção ambiental.

Para etilbenzeno os valores das classes salinas e salobras são menores em comparados com as classes de água doce, o que não ocorre com tolueno que apresenta valores mais altos na água salina e salobra em comparado com a água doce. Os xilenos estão sendo monitorados apenas nas classes de água doce, nas demais classes não constam valores recomendados conforme apresentado no Quadro 7.

Classes	Substâncias	Classe 1 ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	Classe 2 ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )
Águas doces	Benzeno	5	5
	Tolueno	2	2
	Etilbenzeno	90	90
	Xilenos	300	300
Águas salinas	Benzeno	700	700
	Tolueno	215	215
	Etilbenzeno	25	25
	Xilenos	Não Consta	Não Consta
Águas salobras	Benzeno	700	700
	Tolueno	215	215
	Etilbenzeno	25	25
	Xilenos	Não Consta	Não Consta

**Quadro 7 - Valores máximos permitidos do CONAMA 357 de 17 de março de 2005 para águas doces, salinas e salobras, classes 1 e 2.**

Fonte: adaptado de BRASIL (2005).

Para águas doces classe 3 e 4 apenas o limite de benzeno consta na classe de 3, com valor máximo permitido de  $5 \mu\text{g.L}^{-1}$  as demais classes também não ocorre monitoramento.

Para águas subterrâneas a legislação federal estabeleceu padrões com o CONAMA 396/08 (BRASIL, 2008). Nessa legislação os valores foram relacionados com os usos preponderantes da água (Quadro 8).

Para os todos os compostos monoaromáticos apenas para o uso preponderante em consumo humano consta todos os valores máximos permitidos, que é o mesmo da Portaria N. 518 de 17 de março de 2004 que atualmente substituídas pela Portaria N. 2914/2011. Para dessensatação de animais apenas tolueno tem valor máximo permitido de  $24 \mu\text{g.L}^{-1}$ , que é mais baixo em comparado para água de consumo humano, visto que o cálculo para compor o valor máximo leva em conta o tamanho do animal e seu consumo diário de água. Portanto, valores acima de  $24 \mu\text{g.L}^{-1}$  podem promover a perda dentária em animais.

Para o uso em irrigação e recreação não constam valores máximos permitidos para os compostos monoaromáticos, podendo então legalmente, ser usados águas contendo esses compostos para irrigação de alimentos como hortaliças, culturas arbóreas, trigo, milho, feijão e outros.

Usos Preponderantes da água					
Parâmetros	CAS N°.	Consumo Humano (µg.L <sup>-1</sup> )	Dessedentação de Animais (µg.L <sup>-1</sup> )	Irrigação (µg.L <sup>-1</sup> )	Recreação (µg.L <sup>-1</sup> )
Benzeno	71-43-2	5	---	---	10
Tolueno	108-88-3	170	24	---	---
Etilbenzeno	100-41-4	200 (efeito organoléptico)	---	---	---
Xileno Total (o+m+p)	m(108-38-3)	300	---	---	---
	o (95-47-6)		---	---	---
	p(106-42-3)		---	---	---

**Quadro 8 - Valores de referência CONAMA 396/2008 que subdivide a água em usos preponderantes: consumo humano, dessedentação de animais, irrigação e recreação. Fonte: adaptado de BRASIL, (2008).**

A Resolução CONAMA 420 de 28 de dezembro de 2009 (BRASIL, 2009)

"Dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas."

Os valores orientadores para prevenção e investigação estão apresentados no Anexo III dessa Resolução e em seu Artigo 22, descreve seus principais objetivos de eliminar o perigo ou reduzir o risco à saúde humana; eliminar ou minimizar os riscos ao meio ambiente; evitar danos aos demais bens a proteger; evitar danos ao bem estar público durante a execução de ações para reabilitação; e possibilitar o uso declarado ou futuro da área, observando o planejamento de uso e ocupação do solo. No Quadro 9 estão citados os valores orientadores para hidrocarbonetos aromáticos, citados, no Anexo III da Resolução 420/09.

Substância	CAS N°.	RQ	Solo (mg.kg <sup>-1</sup> de peso seco)				Água subterrânea (µg.L <sup>-1</sup> )
			Prevenção	Investigação			Investigação
				Agrícola AP	Residencial	Industrial	
Benzeno	71-43-2	Na	0,03	0,06	0,08	0,15	5
Etilbenzeno	100-41-4	Na	6,2	35	40	95	300
Tolueno	108-88-3	Na	0,14	30	30	75	700
Xilenos	1330-20-7	Na	0,13	25	30	70	500

RQ (Referência de qualidade) Na = não se aplica para substâncias orgânicas AP = área de proteção.

**Quadro 9 - Valores orientadores citados no Anexo III da Resolução CONAMA 420 de 28 de dezembro de 2009. Fonte: adaptado de BRASIL (2009).**

A Resolução CONAMA 430, de 13 de maio de 2011, "Dispõe sobre condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução no 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA." Conforme essa Resolução é vetado o lançamento de qualquer efluente em águas de classe especial e das demais classes conforme descrito no artigo 14 "os efluentes enviados ao corpo receptor não devem acarretar efeitos tóxicos agudos ou crônicos em organismos aquáticos e inviabilizar o abastecimento das populações".

Na Resolução CONAMA 430, de 13 de maio de 2011, no Art. 16 consta:

“ os efluentes de qualquer fonte poluidora somente poderão ser lançados diretamente no corpo receptor desde que obedçam as condições e padrões previstos neste artigo, resguardadas outras exigências cabíveis”.

Na Resolução CONAMA 430, de 13 de maio de 2011 com relação aos padrões de lançamento de efluentes, a presença de BTEX tem seu valores limitados de acordo com Quadro 10.

<b>Substâncias</b>	<b>Valor máximo permitido (mg.L<sup>-1</sup>)</b>
Benzeno	1,2
Tolueno	1,2
Etilbenzeno	0,84
Xilenos	1,6

**Quadro 10 - Valores do CONAMA 430 DE 13 DE MAIO DE 2011, padrões para lançamento de efluentes.**

**Fonte: adaptado de BRASIL (2011).**

Os valores máximos permitidos para o monoaromáticos estabelecidos pelo CONAMA 430/2011 levam em conta a capacidade de suporte do corpo receptor, ou seja, valor máximo de determinado poluente que o corpo hídrico pode receber, sem comprometer a qualidade da água e seus usos determinados pela classe de enquadramento.

Quanto à toxicidade, no Art. 18 do CONAMA 430/2011 “o efluente não deverá causar ou possuir potencial para causar efeitos tóxicos aos organismos aquáticos no corpo receptor, de acordo com os critérios de ecotoxicidade estabelecidos pelo órgão ambiental competente”.

Para consumo de água potável a Portaria N. 2914 de 12 de dezembro de 2011 (que substituiu a Portaria N. 518 de 25 de março de 2004), também regulamenta o teor máximo de monoaromáticos que prejudicam as propriedades físicas, químicas e os parâmetros organolépticos. Os valores máximos permitidos estão citados no Quadro 11.

Parâmetros	CAS N.	Valor máximo permitido ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )
Benzeno	71-43-2	5
Etilbenzeno	100-41-4	200
Tolueno	108-88-3	170
Xileno	130-20-7	300

**Quadro 11 – Valores de BTEX da PORTARIA N. 2914 de 12 de dezembro 2011, referência para água de consumo humano.**

Fonte: adaptado de BRASIL (2011).

No Paraná com o Decreto 1190 de 14 de dezembro de 2004 ficam definidos no município de Curitiba os parâmetros de referência para a qualidade do solo e água subterrânea, considerando a necessidade de estabelecer parâmetros de qualidade agrupando em uso residencial/APA (áreas de proteção ambiental), Comercial/Serviços e Industrial (Quadro 13).

Substâncias	Parâmetros de referência				
	Uso do solo ( $\text{mg.kg}^{-1}$ )			Águas subterrâneas ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	
	Residencial/APA	Comercial/serviços	industrial	RES/APA/Com/serv	Industrial
Benzeno	1,5	1,5	3	5	30
Tolueno	40	40	140	170	1000
Etilbenzeno	1,2	20	20	150	200
Xilenos	6	6	15	70	300

**Quadro 12 – Valores para benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos estabelecidos pelo Decreto 1190.**

Fonte: adaptado de CURITIBA (2004).

O Paraná desde 2006 implantou o monitoramento ambiental baseado na Ecotoxicologia aquática com a Portaria 19/2006 (PARANÁ, 2006) dividindo as categorias das indústrias instaladas em seu território. A Portaria indicou o uso de diferentes níveis tróficos conforme Quadro 13, que são os mesmos utilizados para os testes de monoaromáticos.

Em 2009 a Resolução CEMA 70 veio a contribuir com a Portaria 19/2006 acrescentando mais ramos de atividades industriais conforme demonstrado no ANEXO G. Um ano depois, em 2010 através da Resolução CEMA 81 foram reduzidos os padrões de FT para diversas áreas de atividade e foi determinado que as indústrias precisam atingir metas de redução da carga poluidora.

No ano de 2011 a Resolução SEMA N. 21/2011 regulamentou os valores máximos permitidos para água e solo para monitoramento de passivos ambientais em empreendimentos que em processo de forma direta ou indireta atuem na área de combustíveis ou afins. Essa mesma norma pioneira no Brasil incluiu os testes de toxicidade com *Daphnia magna* e *Vibrio fischeri* como monitoramento de emissão de efluentes de postos de combustíveis e lava car, já demonstrando o entendimento por parte dos órgãos fiscalizadores da complexidade da emissão desses efluentes ao meio ambiente.

Origem dos Efluentes		Limite Máx. de Toxicidade Aguda para <i>D. magna</i>	Limite Máx. de Toxicidade Aguda - <i>V. fischeri</i>	Limite Máx. de Toxicidade - <i>D. subspicatus</i>
Categoria	Subcategoria	FT <sub>D</sub>	FT <sub>B</sub>	FT <sub>A</sub>
Metal Mecânico	Siderúrgica	8	8	8
	Metalúrgica,	8	8	8
	Galvanoplastia.	16	8	8
Resíduos Urbanos	Efluentes de Aterros Sanitários	8	8	8
Papel e Celulose	---	8	8	8
Couros,peles e produtos similares	---	8	8	8
Têxtil	Beneficiamento de fibras naturais e sintéticas, confecção e Tinturaria.	8	8	8
Química	Agroquímica, Petroquímica, Produtos Químicos não especificados ou não classificados.	8	8	8
Farmacêutica	---	8	8	8
Demais Atividades	---	8	8	8

**Quadro 13 - Portaria IAP N. 19 de 10 de fevereiro de 2006 - Tabela de Limites Máximos de Toxicidade Aguda para *Daphnia magna*, *Vibrio fischeri* e *Desmodesmus subspicatus*.**

Fonte: adaptado de PARANÁ (2006).

Cabe ressaltar que na Resolução do Paraná SEMA n°. 21 – 04 de julho de 2011, para finalidade de identificação de passivo, considera-se sua existência quando os teores de pelo menos 1 (uma) substância analisada, ultrapassar o valor orientador de qualidade estabelecido (Quadro 14).

Substâncias	Valores Orientadores			
	Uso do Solo			Água Subterrânea ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )
	Solo (mg./kg)			
	Agrícola	Residencial	Industrial	
Benzeno	0,06	0,08	0,15	5
Tolueno	30	30	75	700
Etilbenzeno	35	40	95	300
Xileno	25	30	70	500

**Quadro 14 - Resolução SEMA n.º 21 – 04 de julho de 2011.**  
**Fonte: adaptado de PARANÁ (2011).**

A Resolução SEMA 21/2011 - Artigo 22 estabelece os valores máximos de toxicidade são FT=16 para *Daphnia magna* e FT=8 para *Vibrio fischeri* em atendimento a Resolução CONAMA n.º 357/05, Art. 34, § 1º, § 4º itens I, II, III, IV, V e VI e § 5º; contemplando ensaios de ecotoxicologia para fins de controle e monitoramento ambiental.

A legislação ambiental do Estado de São Paulo, regulamentada da Lei n.º 997 de 1976 e aprovada pelo Decreto Estadual n.º 8468 em 1976, estabelece critérios para a prevenção e o controle da poluição do meio ambiente (SÃO PAULO, 1976). O Estado de São Paulo é uma das melhores referências Brasileiras para controle e monitoramento de passivos ambientais utilizando o regulamento CETESB 195/2005 representado no Quadro 15.

Hidrocarbonetos aromáticos voláteis							
Substância	CAS	Referência de qualidade	Prevenção	Intervenção Solo			Água subterrânea $\mu\text{g.L}^{-1}$
				Agrícola APMax	Residencial	Industrial	Intervenção
Benzeno	71-43-2	Não consta	0,03	0,06	0,08	0,15	5
Etilbenzeno	100-41-4		6,2	35,0	40	95,0	300
Tolueno	108-88-3		0,14	30,0	30	75,0	700
Xilenos	1330-20-7		0,13	25,0	30	70,0	500

**Quadro 15 - Valores de referência CESTEB 195-2005 – E, 23 de novembro de 2005 para BTEX.**  
**Fonte: adaptado de CESTEB (2005).**

No Estado de Santa Catarina, a Fundação do Meio Ambiente – FATMA através da Portaria FATMA N.º 17/2002 (SANTA CATARINA, 2002), estabelece os Limites Máximos de Toxicidade Aguda para efluentes de diferentes origens conforme Quadro 16.

Categoria da atividade	Subcategoria da atividade	Limites Máximos de Toxicidade Aguda para <i>Daphnia magna</i>	Limites Máximos de Toxicidade Aguda para <i>Vibrio fischeri</i>
		FD	FD
Metal mecânica	Siderurgia, Metalurgia Galvanoplastia	4	6
		4	6
		16	8
Alimentícia	Frigoríficos, Abatedouros, Laticínios, Cerealistas, Bebidas, Fecularias, Alimentos	2	4
Esgotos domésticos e/ou hospitalares		1	4
Resíduos urbanos	Efluentes de Aterros Sanitários	8	16
Papel e Celulose		2	4
Couros, peles e produtos similares		4	6
Química	Agroquímica, Petroquímica, Produtos químicos não especificados ou não classificados	2	4
Têxtil	Beneficiamento de fibras naturais e sintéticas, confecção e tinturaria	2	2
Farmacêutica		2	4

**Quadro 16 - Valores citados na Portaria N.017 de 18 de abril de 2002. Limites Máximos de Toxicidade Aguda para os microcrustáceos - *Daphnia magna* (Straus, 1820) e para as bactérias bioluminescentes - *Vibrio fischeri*, dos efluentes de diferentes categorias.**

Fonte: adaptado de FATMA (2002).

Em 2006, o Conselho Estadual do Meio Ambiente do Rio Grande do Sul (CONSEMA/RS), com a Resolução nº 129, definiu critérios e padrões de emissão para toxicidade de efluentes líquidos lançados em águas superficiais sendo que fontes poluidoras não devem apresentar toxicidade aguda quando submetidos a ensaios de toxicidade para organismos-teste de pelo menos três diferentes níveis tróficos e toxicidade crônica para dois diferentes níveis tróficos (RIO GRANDE DO SUL, 2006).

A Lista Holandesa hoje referência internacional para controle e monitoramento de passivos ambientais, descreve seus valores de referência em três níveis de poluentes encontrados na água e solo.

Essa lista cita os valores em três categorias sendo valor de referência (S), valor de intervenção (I) e valor de alerta (T). O Valor de referência indica um nível de qualidade do solo e da água subterrânea que permite considerá-los limpos e adequados para sua utilização para qualquer finalidade.

O Valor de intervenção indica um nível de qualidade acima do qual existem riscos para a saúde e para o ambiente. A ultrapassagem desse valor (média) em volume de solo de 25 m<sup>3</sup> ou em 100 m<sup>3</sup> de água subterrânea indica a necessidade de implementação na área avaliada de ações voltadas para a sua remediação. O valor de alerta é um valor médio entre os dois primeiros S e I. Ele indica que já ocorreu certa alteração que diminui, ainda que pouco, as propriedades funcionais do solo ou da água, sendo necessária uma investigação detalhada na área para quantificação dessa alteração.

O Quadro 17 mostra os valores indicados para monitoramento de BTEX em águas que possuem e não possuem argila e matéria orgânica.

Parâmetro	Concentração em peso seco (mg.kg <sup>-1</sup> )		
	Valor de referência(S)	Valor alerta(T)	Valor de intervenção(I)
Benzeno	0,2	15	30
Tolueno	0,2	500	1000
Etilbenzeno	0,2	75	150
Xilenos (soma)	0,2	35	70

**Quadro 17 – Valores de referência para compostos aromáticos (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos) apresentados na Lista Holandesa 6530-3, para águas considerando um solo com teor de argila e matéria orgânica de 0%. Valores em concentração em peso seco (µg.L<sup>-1</sup>).**

Fonte: adaptado de Lista Holandesa (6530)

O Quadro 18 mostra os valores indicados para monitoramento de BTEX em solos que possuam matéria orgânica (10%) e argila (25%) da Lista Holandesa.

Parâmetro	Concentração (mg.kg <sup>-1</sup> )		
	Valor de referência(S)	Valor alerta(T)	Valor de intervenção (I)
Benzeno	0,05	0,53	1
Tolueno	0,05	65,0	130
Etilbenzeno	0,05	25,0	50
Xilenos (soma)	0,05	12,5	25,0

**Quadro 18- valores de referência para compostos aromáticos (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos) apresentados na Lista Holandesa 6530-3, para águas considerando um solo com teor de argila de 25 % e 10% de matéria orgânica. Valores em concentração em peso seco (µg.L<sup>-1</sup>).**

Fonte: adaptado de Lista Holandesa (6530)

Referenciando os valores de outros países o Quadro 19 cita os valores aplicados para controle de qualidade para os compostos monoaromáticos em água.

País/Localidade	Critério	Substância ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )		
		Benzeno	Tolueno	Xilenos
USA (EPA)	Potabilidade	5	40	20
Canadá (Groundwater Severe Contamination Indicador). Quebec	Potabilidade	5	100	60
Alemanha	Valor-gatilho	1	NE	NE
	Consumo humano TrinkwV Mai 2001 (BGBl. I Nr. 24 vom 28.5. 2001 S. 959; 25.11.2003 S. 2304; 31.10.2006 S. 2407)	1	NE	NE
USA/ Connecticut	Com base no risco	1	1400	10
	Com base na proteção as águas subterrâneas	1	1000	NE
Holanda	Multifuncionalidade	30	1000	70

NE – não estabelecido.

**Quadro 19- Valores de referência internacional para BTEX em águas.**

**Fonte: adaptado CESTEB, 2001 (Relatório de estabelecimento de valores orientadores para solos e águas subterrâneas no estado de São Paulo, 2001).**

### 3.5 ESTUDOS RELACIONADOS À PRESENÇA E TOXICIDADE DE BTEX

Conforme Lista Holandesa um ambiente aquático é considerado limpo e adequado quando os BTEX estão em concentração de até  $0,2 \mu\text{g.L}^{-1}$ . De acordo com Silva *et al.* (2002), as concentrações de BTEX encontradas num aquífero contaminado com gasolina em Itaguaí-RJ foram de  $800 \mu\text{g.L}^{-1}$  para o benzeno,  $600 \mu\text{g.L}^{-1}$  para o tolueno e  $900 \mu\text{g.L}^{-1}$  para o xileno. Kulkamp; Corseuil; Amorin (2002) citam as concentrações de BTEX encontradas num aquífero contaminado simultaneamente com óleo diesel e etanol como sendo de 4,9; 2,3; 0,5 e  $4,2 \text{ mg.L}^{-1}$ , respectivamente.

Donaire (2005) determinou concentrações de BTEX encontradas em amostras de água subterrânea coletada em São Vicente-SP e encontrou valores médios de 6,3; 2,1; 3,1 e  $2,7 \text{ mg.L}^{-1}$  para benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno, respectivamente. Em amostras coletadas de água subterrânea da cidade de Americana-SP, os valores encontrados para o mesmo grupo de compostos foram de 7,4; 5,1; 5,3 e  $3,7 \text{ mg.L}^{-1}$ .

Headley *et al.* (2001), realizaram avaliação de grande número de amostras de águas subterrâneas contaminadas com BTE e também determinaram a toxicidade empregando a bactéria (*V. fischeri*), vertebrado (*P. Pomelas*), invertebrado (*D. magna*) e semente de alface (*L. sativa*).

No estudo realizado por Headley *et al.* (2001) os ensaios com vertebrados e invertebrados mostraram sensibilidade em concentrações baixas (menor que  $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ ), enquanto que para os ensaios com bactéria luminescente (sistema microtox<sup>®</sup>) a sensibilidade foi acima de  $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$  de BTEX. A maioria das amostras com concentrações entre 0 e  $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de BTEX apresentaram inibição de 90% a 100% em *Daphnia*. Os níveis de BTEX entre  $0,1$  e  $5 \text{ mg.L}^{-1}$  apresentaram toxicidade variável (inibição de 30 a 70% da luminiscência), enquanto as amostras acima desse valor foram altamente tóxicas. Os autores afirmam, que apesar de níveis de BTEX baixos não terem demonstrado alta toxicidade, todo cuidado deve ser tomado uma vez que dentro do grupo BTEX a toxicidade dos seus componentes individuais é variável.

Tosato *et al.* (1993) testaram a toxicidade de tolueno empregando *Daphnia magna*, e o valores de CL50(48h) foi em média de  $30,8 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ .

Herman; Inniss; Mayfield (1990) observaram o impacto de hidrocarbonetos aromáticos voláteis sobre o crescimento da alga *Selenastrum capricornutum*, atualmente designada como *Pseudokirchneriella subcapitata*, e chegaram aos resultados de CE50 para benzeno e tolueno,  $41 \text{ mg.L}^{-1}$  e  $9,4 \text{ mg.L}^{-1}$  respectivamente.

Donaire (2005) realizou trabalho visando o tratamento de água contaminada com gasolina. Os organismos testes foram *Daphnia similis* e a alga *Selenastrum capricornutum*. Foram realizados ensaios com várias diluições a partir de BTEX com  $145,6 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$  e a toxicidade para *Daphnia similis* com CE50-48 h foi a inibição entre 10,5-19% o que corresponde a faixa entre  $1,5 - 2,8 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ . Nessas amostras a concentração de benzeno era de  $22,6 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ . Entretanto não foi possível obter resultados de toxicidade utilizando a alga após 72 horas de incubação, visto que a amostra controle apresentou fluorescência no mesmo comprimento de onda de excitação da alga (680 nm), inviabilizando a utilização deste teste para esse tipo de amostra.

Para organismos aquáticos concentrações de  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  de compostos monoaromáticos produzem efeitos tóxicos agudos em algas, dafinídeos e peixes (US EPA, 2010). De acordo com Vieira (2004) os BTEX matam o meroplâncton, ictioplâncton ou outros estágios de vida de organismos a eles expostos na coluna d'água, mesmo em concentrações inferiores a  $5 \text{ mg.L}^{-1}$ .

Alguns estudos científicos relacionados com compostos monoaromáticos estão apresentados nos Quadros 20-23.

Organismo teste	Duração (h)	CL 50 ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	Referência
<i>Artemia salina</i> (crustáceo)	24	127.325	Abernethy <i>et al.</i> , 1986
<i>Artemia sp</i> (crustáceo)	48	97.800	MacLean; Doe, 1989
<i>Asellus aquaticus</i> (crustáceo)	48	120.000	Slooff, 1983
<i>Ceriodaphnia dubia</i> (crustáceo)	24	18.400	Marchini <i>et al.</i> , 1993
	168	12.419	Niederlehner; Cairns; Smith, 1998
<i>Chironomus thummi</i> (artrópode, Díptero)	48	100.000	Slooff, 1983
<i>Corixa punctata</i> (artrópode, hemíptero)	48	48.000	Slooff, 1983
<i>Platichthys flesus</i> (peixe)	97	10.864	Furay ; Smith, 1995
<i>Daphnia magna</i> (crustáceo)	24	250.000	LeBlanc, 1980
	48	200.000	LeBlanc, 1980
	48	682.000	Eatmond; Booth; Lee, 1984
	48	76.900	MacLean; Doe, 1989
	48	400.000	Canton; Adema, 1978
<i>Daphnia pulex</i> (crustáceo)	96	15.000	Trucco <i>et al.</i> , 1983
	48	265.000	Canton; Adema, 1978
<i>Daphnia cucullata</i> (crustáceo)	48	356.000	Canton; Adema, 1978
<i>Diaptomus forbesi</i> (artrópode)	96	710.000	Saha; Konar, 1983
<i>Gammarus fossarum</i> (crustáceo)	120	58.000	Erben; Pisl, 1993
<i>Gammarus pseudolimnaeus</i> (crustáceo)	96	12.100	Brooke, 1987
<i>Gammarus pulex</i> (crustáceo)	48	42.000	Slooff, 1983
<i>Hydra oligactis</i> (cnidário)	48	34.000	Slooff <i>et al.</i> , 1983
<i>Ictalurus punctatus</i> (peixe)	24	425.000	Mayer; Ellersieck, 1986
<i>Katylisia opima</i> (molusco)	24	225.000	Dange; Masarekar, 1984
<i>Lepomis macrochiru</i> (peixe)	24	400.000	Mayer; Ellersieck, 1986
<i>Lymnaea stagnalis</i> (molusco)	24	440.000	Slooff, 1982
	48	230.000	Slooff <i>et al.</i> , 1983
<i>Mugil curema</i> (peixe)	48	22.000	Correa ;Garcia, 1990
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (peixe)	24	9.200	Mayer; Ellersieck, 1986
	96	5.900	Galassi <i>et al.</i> , 1988
<i>Oncorhynchus gorbuscha</i> (peixe)	96	4.628	Moles; Rice; Korn, 1979
<i>Oryzias latipes</i> (peixe)	24	74.000	Tsuji <i>et al.</i> , 1986
<i>Pimephales promelas</i> (peixe)	168	14.010	Marchini <i>et al.</i> , 1992
	96	24.600	Geiger; Brooke; Call, 1990
<i>Platichthys flesus</i> (peixe)	97	10.864	Furay; Smith, 1995
<i>Poecilia reticulata</i> (peixe)	96	28.600	Galassi <i>et al.</i> , 1988
<i>Scylla serrata</i> (crustáceo)	24	7.146	Rao <i>et al.</i> , 1988

Quadro 20- Estudos científicos sobre toxicidade do benzeno.

Organismo teste	Duração(h)	CL 50 ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	Referência
<i>Americamysis Bahia</i> (crustáceo)	72	4.000	Masten <i>et al.</i> , 1994
<i>Artemia salina</i> (crustáceo)	24	11.326	Abernethy <i>et al.</i> , 1986
<i>Artemia sp</i> (crustáceo)	48	8.780	MacLean; Doe, 1989
<i>Ceriodaphnia dubia</i> (crustáceo)	168	3.611	Neiderlehner <i>et al.</i> , 1998
	168	0,13*	Tatarazako <i>et al.</i> , 2002
	168	0,06**	Tatarazako <i>et al.</i> , 2002
<i>Daphnia magna</i> (crustáceo)	24	77.000	LeBlanc, 1980
	48	75.000	LeBlanc, 1980
	48	18.400	MacLean; Doe, 1989
<i>Gammarus pseudolimnaeus</i> (crustáceo)	96	1.940	Brooke, 1987
<i>Lepomis macrochirus</i> (peixe)	24	169.000	Buccafusco; Ells; Leblanc, 1981
<i>Menidia menidia</i> (peixe)	24	7.000	Masten <i>et al.</i> , 1994
<i>Mysidopsis bahia</i> (crustáceo)	96	87.600	USEPA, 1978
<i>Pimephales promelas</i> (peixe)	96	9.090	Geiger; Brooke; Call, 1990
	96	12.100	Geiger <i>et al.</i> , 1986

Quadro 21 - Estudos científicos sobre toxicidade do Etilbenzeno.

\* Valores em CEO, \*\*Valores em CENO

Organismo teste	Duração (h)	CL 50 ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	Referência
<i>Ceriodaphnia dubia</i> (crustáceo)	168	3.409	Niederlehner; Cairns; Smith, 1998
<i>Ceriodaphnia dubia</i> (crustáceo)	96	9.000	Marchini <i>et al.</i> , 1993
<i>Clarias lazera</i> (peixe)	96	26.200	Ghazaly, 1991
<i>Daphnia magna</i> (crustáceo)	48	310.000	LeBlanc, 1980
<i>Morone saxatilis</i> (peixe)	96	6.398	Benville; Korn, 1977
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (peixe)	96	5.800	Galassi <i>et al.</i> , 1988
<i>Pimephales promelas</i> (peixe)	96	18.000	Devlin; Brammer; Puyear, 1982
	96	25.000	Devlin, 1983
	96	31.700	Geiger <i>et al.</i> , 1990
	96	9.390	Marchini <i>et al.</i> , 1992
<i>Pimephales promelas</i> (peixe)	96	17.000	Marchini <i>et al.</i> , 1993
<i>Poecilia reticulata</i> (peixe)	96	28.200	Galassi <i>et al.</i> , 1988

Quadro 22 – Estudos científicos sobre toxicidade do Tolueno.

Organismo teste	Duração (h)	CL 50 ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	Referência
<i>Artemia salina</i> (crustáceo)	24	5,7	Calleja; Persoone; Geladi, 1994
<i>Brachionus calyciflorus</i> (rotífero planctônico)	24	9,2	Calleja; Persoone; Geladi, 1994
<i>Danio rerio</i> (peixe)	48	20.000	Slooff, 1979
<i>Lepomis macrochirus</i> (peixe)	24	25.600	Bailey <i>et al.</i> , 1985
<i>Streptocephalus proboscideus</i> (crustáceo)	24	2,6	Calleja; Persoone; Geladi, 1994

**Quadro 23- Estudos científicos sobre toxicidade do xileno.**

Pelos dados mostrados nos quadros de 20 a 23, observa-se a grande diferença nas concentrações de CL50 relacionados com hidrocarbonetos monoaromáticos.

Correa e Garcia (1990) estudaram a intoxicação de peixes com benzeno, e concluíram que o benzeno modifica a troca gasosa e tem influência na taxa de respiração e também sobre o ciclo de catabolismos da glicose.

Furay e Smith (1995) declaram que pouco se sabe sobre a ecotoxicidade de benzenos clorados particularmente em peixes de importância econômica mundial. Em seu estudo com benzenos clorados utilizaram acetona destilada para solubilizar o benzeno em solução aquosa e sua metodologia foi OECD - *guidelines for the testing of chemicals; Fish Acute Toxicity Tests*. (OECD, 1981). Com o uso da acetona a CL50 foi menor em comparação com os estudos de Correa e Garcia (1990).

Mayer e Ellersieck (1986) empregaram metodologia baseada no no guia da OECD (métodos europeus). Foi considerado o valor tabelado da solubilidade dos compostos em água e realizado a extração líquido-líquido dos componentes em estudo, provendo a eliminação da fase sobrenadante. Marchini *et al.* (1992) também utilizou o equilíbrio químico como forma de solubilização de solventes.

Tatarazako *et al.* (2002) usaram a metodologia USEPA, 1994 - *Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organism*, utilizando metanol em seus testes com solventes não miscíveis em água. Seus estudos são os mais recentes com monoaromáticos utilizando *Ceriodaphnia dubia*, e seus resultados foram baseados na infertilidade.

Calleja; Persoone; Geladi (1994) utilizaram crustáceos de água doce para seus estudos com xilenos, pois para esses cientistas o mais sensível bioindicador são os crustáceos principalmente a *Daphnia magna*. Em todos seus estudos são adeptos ao uso do TSK para cálculos de CE50 e CL50.

Alguns estudos dos quadros 20 ao 23 não foram possíveis evidenciar de forma clara a estratégia de preparo das soluções contendo os solventes monoaromáticos, a quantidade de organismos por solução teste e condições ambientais impossibilitando as comparações dos dados encontrados.

Dos estudos encontrados os que mais se aproximam desse trabalho com monoaromáticos com o uso de metanol são de Calleja Persoone; Geladi (1994) e Tatarazako et al. (2002) que foram os dados mais baixos de CL50.

### 3.6 DADOS DISPONÍVEIS NAS FICHAS DE SEGURANÇA DE PRODUTOS QUÍMICOS (FISPQ)

De acordo com a ABNT NBR 16.725 (2011) é necessário dados de informações de produtos químicos para o fornecimento, assegurando à proteção, saúde, segurança e meio ambiente e que essas informações sejam de conhecimento público.

A Petrobras Distribuidora, por exemplo, elabora fichas de informação de segurança sobre produtos químicos, em que constam dados como fabricação, promoção e aspectos que possam causar danos ao meio ambiente e à saúde humana. Pela ficha de segurança da Petrobrás BR 600 (2011) o tolueno produz uma concentração letal CL 50 de 6 ppm em *Daphnia magna* em exposição de 48 horas.

Na ficha de segurança FISPQ IN 0002 (2011) o etilbenzeno produz os seguintes efeitos: CL50 (*Fathead minnow*) entre 12 - 96 mg.L<sup>-1</sup> (96 h); EC50 (*Photobacterim phosphoreum*) de 9,68 ppm (30 min); EC50 (*Daphnia magna*) de 2,1 mg.L<sup>-1</sup> (48 h), CL50 (*Bahia shrimp*) de 88 mg.L<sup>-1</sup> (96 h); CL50 (*Grass shrimp*) entre 10 - 14 mg.L<sup>-1</sup> (24 h).

Conforme BRASKEM (2008) o xileno produz CL50 (96 h) – peixe (*Fathead minnow*) de 16 mg.L<sup>-1</sup> enquanto na FISPQ Número 00037 da SOVEREIGN BRASIL (2009) o xileno induz em diversos peixes entre 10 e 100 mg.L<sup>-1</sup> de CL50 em 96 horas.

Na ficha de segurança da Petrobrás (2011) é informado que os xilenos são produtos tóxicos para a vida aquática mesmo em baixas concentrações mais não informam os dados.

Conforme Petrovila (2008) os xilenos induzem os efeitos: CL50 peixes: *Rainbow trout* em 13,5 mg.L<sup>-1</sup> em 96 horas. *Fathead minnow* 14 mg.L<sup>-1</sup> por 1 hora; 42 mg.L<sup>-1</sup> em 24-96 horas. Para o organismo *Carassius auratus* de 16,9 ppm em 96 horas. CL50 para ostras de 0,17 e 0,58 mg.L<sup>-1</sup> para os isômeros orto e para, respectivamente. CL50 *Daphnia magna* entre 100 e 1000 mg.L<sup>-1</sup>. CL50 para *Aedes aegypti* foi entre 13,9 mg.L<sup>-1</sup> (larva) e até 22,4 mg.L<sup>-1</sup> (adulto) - isômero orto. Culturas de algas verdes como *Microcystis aeruginosa* e *Scenedesmus quadricauda* expostas a xilenos têm redução na multiplicação celular em concentrações 200 mg.L<sup>-1</sup>. Concentração de xileno de 3 mg.L<sup>-1</sup> por 8 horas causa uma redução de 50% na fotossíntese. Protozoários *Chilomonas paramecium* expostos ao xileno por um período de 48 horas, têm redução na multiplicação celular em concentrações menores de 80 mg.L<sup>-1</sup>. Uma concentração de 100 mg.L<sup>-1</sup> de xilenos é tóxica para plantas das espécies *Elodea canadensis*, *Potamogeton nodosus* e *pectinatus*. Culturas de bactéria *Pseudomonas putida* expostas a xilenos têm redução na multiplicação celular em concentrações 200 mg.L<sup>-1</sup>.

Pela Emfal (2007) o xileno tem CL50 para humanos em 200 ppm e DL50 de 50 mg.kg<sup>-1</sup>, DL50 em ratos entre 4.000-5000 mg.kg<sup>-1</sup> e DL50 dérmica em coelhos > 1700 mg.kg<sup>-1</sup>. Também informa que o xileno é tóxico para a vida aquática mais não traz referência de dados numéricos.

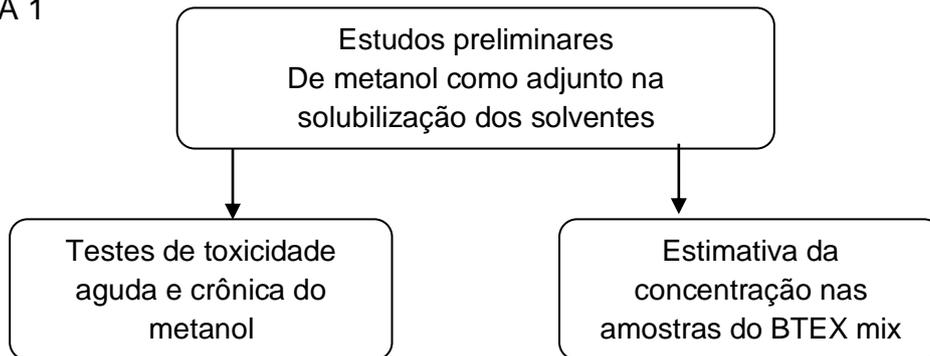
Para o xileno conforme Bandeirante (2012), a substância possui efeitos sobre os organismos aquáticos sendo CL50(96 h) – peixe (*Fathead minnow*) 16 mg.L<sup>-1</sup>, LC50(48h) – peixe (*Golden orfe*) 110 mg.L<sup>-1</sup> e CL50(5min) – bactéria (*photobacterium phosphoreum*) 16 ppm.

Para etilbenzeno conforme a Innova (2006), a substância possui efeitos sobre os organismos aquáticos sendo CL50 – 96h (*Bluegill sunfish*, *Goldfish*, *Fathead minnow*) entre 12 a 96 mg.L<sup>-1</sup> para todos. Para bactéria (*Photobacterium phosphoreum*) o CE50 é 2,1 mg.L<sup>-1</sup> (30 minutos). Para *Daphnia magna* o CE50 (48h) é 2,1 mg.L<sup>-1</sup> e CL50 (96h) para *Bahia shrimp* é 88 mg.L<sup>-1</sup> e CL50 (24h) para *Grass shrimp* entre 10 a 14 mg.L<sup>-1</sup>.

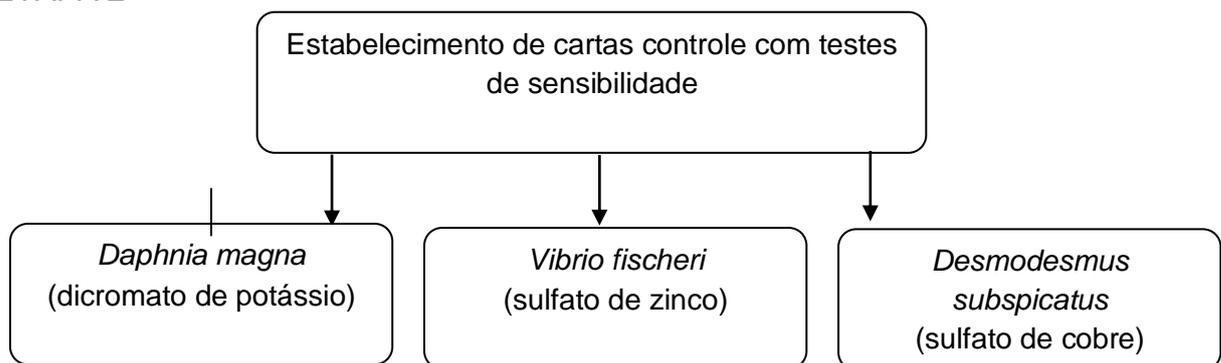
## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos deste trabalho foram realizados em pela autora no Laboratório TECLAB Tecnologia em Análises Ambientais. A pesquisa experimental foi dividida em três etapas conforme Figura 8.

### ETAPA 1



### ETAPA 2



### ETAPA 3

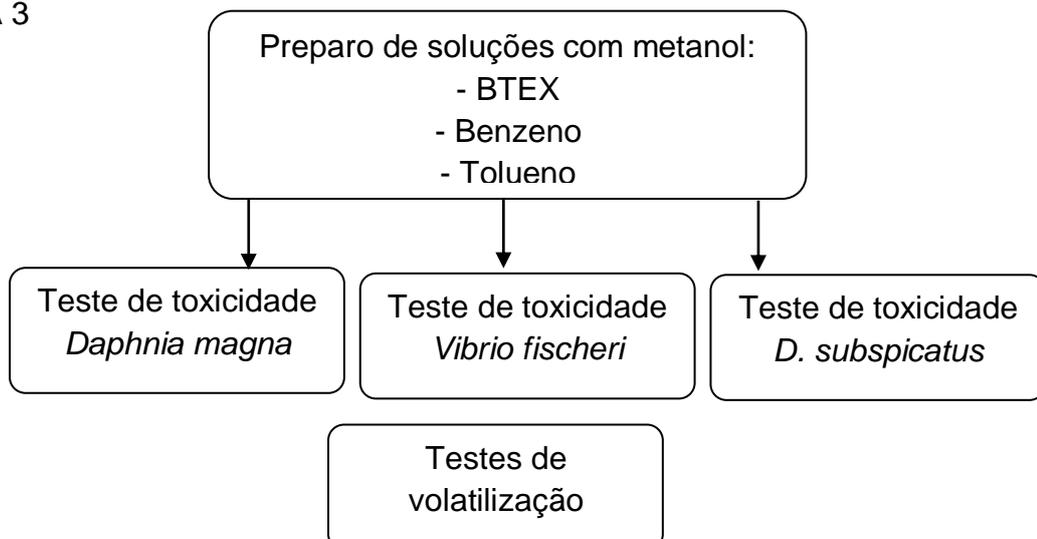


Figura 8 – Fluxograma dos testes agudos e crônicos com *Daphnia magna*, *Vibrio fischeri* e *Desmodesmus subspicatus* expostos aos hidrocarbonetos aromáticos.

#### 4.1 ESTUDOS PRELIMINARES PARA DETERMINAÇÃO DA TOXICIDADE DE METANOL EM ÁGUA

Para a preparação das soluções aquosas de metanol foi utilizado reagente comercial MERCK I550509034, vencimento 31/07/15, pureza de 99,9%. Foram preparadas soluções estoques com concentração de 1000 mg.L<sup>-1</sup> de metanol em água. A água utilizada foi água grau reagente MiliQ.

Para os ensaios de toxicidade aguda empregando a *Daphnia magna* foram preparadas soluções com concentrações de 0,1; 1; 10; 100; 500 e 1000 mg.L<sup>-1</sup>. Para os testes de toxicidade aguda com a bactéria *Vibrio fischeri* foram preparadas as soluções: 10; 50; 70; 100; 120; 150 e 200 mg.L<sup>-1</sup>. Para a realização dos testes de toxicidade crônica com *Desmodesmus subspicatus* foram preparadas as soluções com concentração de 0,1; 1; 5; 10; 50; 100; 500; 1000 mg.L<sup>-1</sup>. Os ensaios de toxicidade foram realizados de acordo com metodologias citadas no Quadro 24.

Ensaio de Toxicidade com	Metodologia descrita na Norma	Método de determinação	Referência
<i>Daphnia magna</i>	ABNT NBR 12713/2009	Toxicidade aguda – Método de ensaio com <i>Daphnia spp</i> (Crustáceo Cladocera).	ABNT (2009)
<i>V. fischeri</i>	ABNT NBR 15411/2006	Toxicidade aguda. Determinação do efeito inibitório de amostras de água sobre a emissão de luz de <i>Vibrio fischeri</i> (ensaio de bactéria luminescente).	ABNT (2006)
<i>Desmodesmus subspicatus</i>	ABNT NBR 12648/2011	Toxicidade crônica. Método de ensaio com algas (Chlorophyceae).	ABNT (2011)

**Quadro 24 – Ensaios e metodologias empregados nos estudos de toxicidade.**

#### 4.2 PROCEDIMENTOS PARA PREPARO DAS AMOSTRAS DE BTEX

As soluções testes de BTEX foram preparadas a partir de um padrão comercial de BTEX – Mix da supelco SUPE-47993-EA: Padrão BTEX 2000 mg.L<sup>-1</sup> em metanol. Esse padrão contém 2000 mg.L<sup>-1</sup> de benzeno, tolueno, etilbenzeno, xileno (*m, p*), xileno (*o*) dissolvidos em metanol. A apresentação do produto é em ampolas de 1 mL. O BTEX (Mix) foi diluído em água grau reagente MiliQ e foi preparado uma solução mãe de 2000 µg.L<sup>-1</sup> a partir da qual foram aliqüotadas soluções para os ensaios de toxicidade e de volatilidade.

#### 4.3 PROCEDIMENTOS PARA PREPARO DAS AMOSTRAS DE BENZENO E TOLUENO

Para soluções de tolueno foi utilizado reagente comercial MERCK K 41955325106, pureza de 99,9% e para as soluções de benzeno MERCK - art.1783 5777, com validade até 2016 e pureza de 99,9%.

Na preparação de soluções aquosas de benzeno e tolueno foram utilizados balões volumétricos de 100, 500 e 1000 mL. Para o preparo de cada solução foi empregado água grau reagente MiliQ. Inicialmente foi adicionada água (aproximadamente 80% do volume do balão), metanol 99,9% em concentração de 100 mg.L<sup>-1</sup> e em seguida o hidrocarboneto (benzeno ou tolueno).

Os volumes de metanol, benzeno e tolueno foram transferidos empregando micropipetas e no caso de volumes muito reduzidos foram utilizados microseringas. Todo o processo foi realizado o mais breve possível para reduzir perdas por volatilização. Para a realização dos testes de toxicidade e de volatilidade foram preparadas, minutos antes de cada procedimento, as soluções listadas nas Tabelas 1 e 2.

**Tabela 1 - Concentrações preparadas para os testes de volatilização e testes de toxicidade aguda. Testes realizados em duplicata.**

Ensaio	Solução teste	Volatilização (µg.L <sup>-1</sup> )	Teste preliminar (µg.L <sup>-1</sup> )	Teste definitivo (µg.L <sup>-1</sup> )
<i>Daphnia magna</i>	BTEX (Mix)	250	25; 50; 70; 100; 200; 400; 1000; 1500	800; 900; 1000; 1100; 1200; 1300; 1500
	Benzeno	150, 250, 500	10; 100; 1000; 10000	50; 70; 100; 150; 250; 350
	Tolueno	150, 250, 500	10; 50; 100; 150; 170; 200	50; 60; 70; 80; 100; 150
<i>Vibrio fischeri</i>	BTEX (Mix)	250	10; 25; 50; 75; 100; 500; 1000	400; 450; 500; 550; 600
	Benzeno	100	20; 100; 150; 200; 250; 500; 600.	450; 500; 550; 600; 650
	Tolueno	100	200, 220; 250; 300; 350	200, 220; 250; 300; 350

**Tabela 2 - Concentrações preparada para os testes de volatilização e testes de toxicidade crônica. Testes realizados em triplicata.**

Ensaio com	Solução teste	Volatilização ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	Teste 1 ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	Teste 2 ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )
<i>Desmodesmus subspicatus</i>	BTEX (Mix) em $\mu\text{g.L}^{-1}$ .	-	10; 50; 70; 100; 200; 400; 1000	10; 50; 70; 100; 200; 400; 1000
	Benzeno em $\mu\text{g.L}^{-1}$ .	100	10; 50; 100; 250; 500; 1000	Não foi realizado
	Tolueno em $\text{mg.L}^{-1}$ .	150, 250, 500 e 5000	0,1; 1; 5; 10; 20; 50	2; 5; 6; 7; 8; 10

#### 4.4 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS

##### 4.4.1 Cromatografia gasosa – CG/FID.

A Cromatografia gasosa foi utilizada para caracterização cromatográfica das soluções teste BTEX-mix e nos estudos de volatilização dos mensurandos BTEX(mix), benzeno e tolueno. O limite de quantificação do método utilizado foi de  $1 \mu\text{g.L}^{-1}$ .

A metodologia utilizada para as análises cromatográficas foi o EPA METHOD 3810, Revisão 0, September, 1986 (USEPA, 1986). A técnica usada foi de cromatografia gasosa com detector FID (*flame ionization detector*) com gás de arraste nitrogênio e injeção via *hedspace* manual para determinação das concentrações das soluções em teste. Os gases usados foram o hidrogênio, nitrogênio e ar sintético, com grau de pureza igual ou acima de 4.7.

O volume de amostra utilizada no ensaio cromatográfico foi de (10 mL) foi transferida para o frasco de *Hedspace* - vial de 20 mL com tampa rosca lacre - Part Number: 5188-2759 - Agilent Technologies. Para concentrações superiores as da curva de calibração foram necessárias diluições da amostra. Após adição da amostra e fechamento, o vial foi mantido em estufa de  $90^{\circ}\text{C}$  por 1 hora para a promoção do *hedspace* conforme o estabelecido pela metodologia utilizada. Após a retirada da estufa, com uma seringa foram aspiradas 500 microlitros do vapor e injetado (Figura 9, Tabela 3).

**Tabela 3 - Condições cromatográficas para determinação de BTEX via CG FID.**

<b>Equipamento</b>	<b>Condições padronizadas para análises</b>
Cromatógrafo	HP 5890 série II
Coluna	DB 624 J&W SCIENTIFIC 30 m x 0,5 mm FILM 3,0 $\mu\text{m}$
Temperatura do Injetor:	220° C
Temperatura do detector:	250° C
Gás de arraste	Nitrogênio 5.0
Rampa:	Início de 40° C por 5 minutos 10° C.min <sup>-1</sup> até 180°C 180°C por 5 minutos

**Figura 9 - Cromatógrafo HP 5890 série II (esquerda) e processo de injeção de amostra no cromatógrafo (direita).****FONTE: TECLAB.**

O padrão utilizado para o estabelecimento da curva de calibração foi da ACCUSTANDARD CLP- BTEX-10X PAK 2 mg.mL<sup>-1</sup> em metanol, padrão ISO 34 e acreditado 17025/2005.

Foi utilizado o programa PEAK instalado no cromatógrafo para identificar os picos do cromatograma, sendo a seqüência: 1 – metanol, 2- benzeno, 3- tolueno, 4- etilbenzeno, 5 *m,p*-xilenos e 6 *o*-xileno, o que corresponde a seqüência analítica convencional (Figura 10).

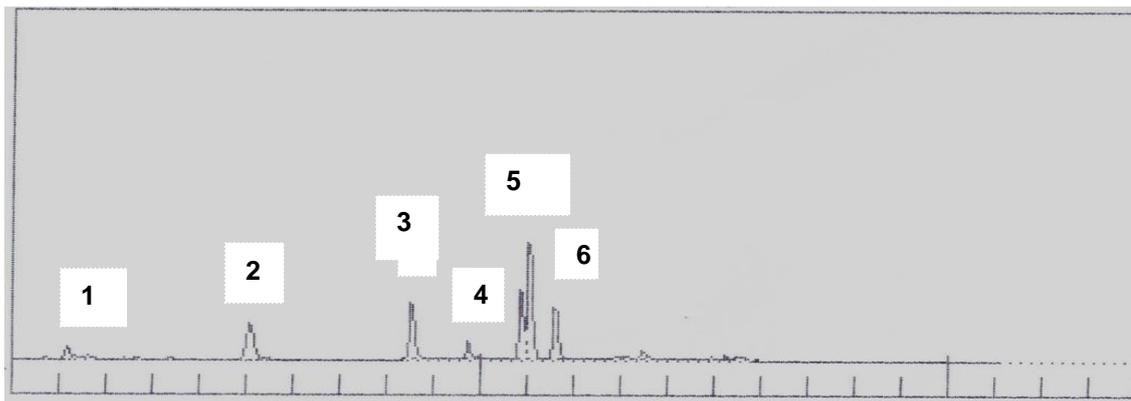


Figura 10 – Exemplo de Cromatograma (CG/FID) onde os picos estão representados na sequência 1 – metanol (tempo de retenção 1,3 minutos), 2- benzeno (tempo de retenção 4,9 minutos), 3- tolueno (tempo de retenção 8 minutos), 4-etilbenzeno (tempo de retenção 10,4 minutos), 5 - *m,p* xilenos (tempo de retenção 10,8 minutos) e 6 *o*-xileno (tempo de retenção 11,1 minutos)

FONTE: Autor

#### 4.4.2 Cromatografia gasosa – CG MS/MS

Essa técnica foi utilizada para estudo da interferência da matriz com a realização de “spikes” nas matrizes: meio básico M4 (empregado nos ensaios com *Daphnia magna*), pré-cultura e meio CHU (empregado nos ensaios com *Desmodesmus subspicatus*), solução contendo meio de cultivo de *Vibrio fischeri* salinizado. O limite de quantificação foi de 1 µg.L<sup>-1</sup>.

A metodologia utilizada para o ensaio foi EPA METHOD 3810, Revisão 0, September, 1986 (USEPA, 1986). A técnica de cromatografia gasosa em detector massa com gás de arraste hélio e a injeção de vapor via *hedspace* realizada empregando amostrador automático GS sampler 80. Foi utilizado para o ensaio o cromatógrafo Agilent Technologies 7890A – G3430A (Figura 11). O detector de massa desse equipamento é o ION TRAP 220 GC/MS G3930A, com coluna cromatográfica VF-5ms Agilent Technologies part. No CP8944 – 30 x 0,25 x 0,39 mm, 0,25µm. O volume de amostra utilizada foi de 10 mL e o frasco de *Hedspace* - vial de 20 mL com tampa rosca lacre. Os dados obtidos foram gerados pelo programa Workstation instalada no cromatógrafo.

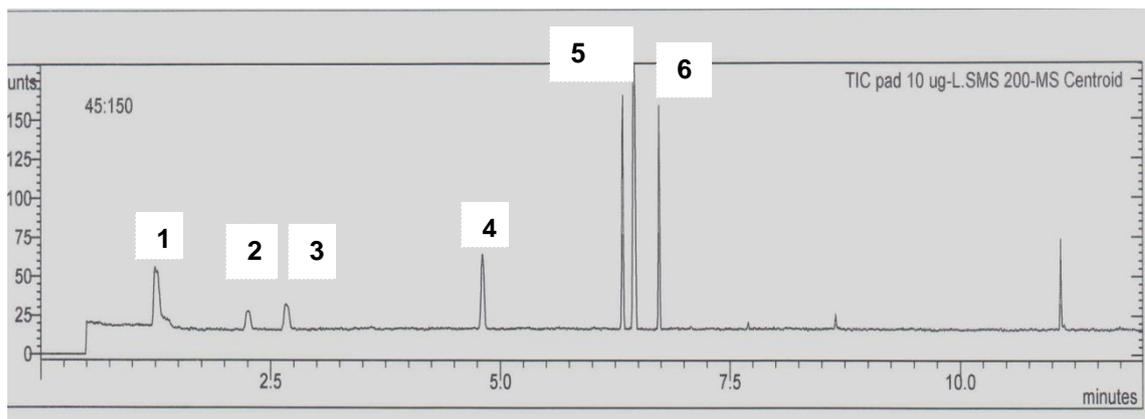


**Figura 11 - Equipamento Cromatógrafo Agilent Technologies 7890A – G3430A**  
**FONTE: TECLAB**

O padrão utilizado para realização da curva de calibração foi da ACCUSTANDARD CLP- BTEX-10X PAK 2 mg.mL<sup>-1</sup> (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos) em metanol. Esse padrão é ISO 34 e acreditado 17025/2005. Um resumo das condições cromatográficas utilizadas está apresentado da Tabela 4.

<b>Tabela 4 - Condições cromatográficas para determinação de BTEX via CG MS/MS</b>	
<b>Cromatógrafo</b>	<b>Agilent Technologies 7890A, ION TRAP 220 GC/MS</b>
Coluna	VF-5ms Agilent Technologies (dimensões: 30 x 0,25 x 0,39 mm, 0,25µm)
Temperatura do Injetor:	220° C
Temperatura do detector massa:	150° C
Gás de arraste	Héio 6.0
Manifold	40° C
Transferline	120° C
Rampa:	Início de 40° C por 5 minutos 10° C.min <sup>-1</sup> até 180° C 180° C por 5 minutos
Volume de Injeção	2000 µL

Um exemplo de cromatograma CG/MS para análise de BTEX-Mix em metanol está apresentado na Figura 12.



**Figura 12 - Cromatograma (CG/MS) onde os picos estão representados na sequência 1 – metanol, 2- benzeno,3- tolueno, 4-etilbenzeno, 5 -*m,p* xilenos e 6- *o*-xileno**  
**FONTE: Autor**

#### 4.5 ENSAIOS DE TOXICIDADE AGUDA EMPREGANDO *Daphnia magna*

Os bioensaios foram executados de acordo com a Norma ABNT NBR 12713/09 – Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com *Daphnia spp* (Crustacea, Cladocera).

##### 4.5.1 Cultivo e Manutenção da *Daphnia magna*

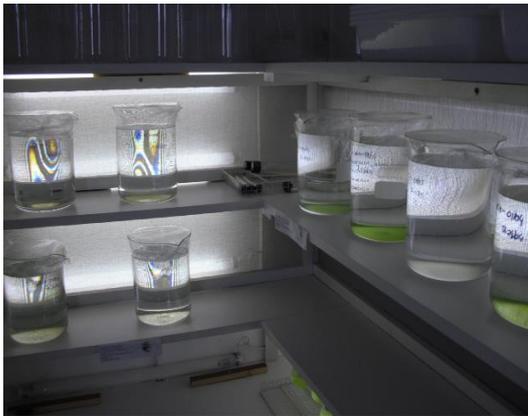
Para o cultivo da *Daphnia magna* foi preparada uma água de cultivo composta por Meio Básico – M4 (soluções preparadas conforme ANEXO A). O meio M4, deve possuir sais essenciais característicos da água natural (Ca, Mg, K, Na) e acrescentados de elementos traços e vitaminas. A água utilizada foi a água mineral marca Ouro fino®, isenta de tóxicos como pesticidas e metais o que garante longas gerações de dafinídeos por muitos anos no laboratório.

Para execução de cada conjunto de experimentos a água de cultivo foi aerada por 24 horas. Os valores de dureza e pH foram analisados visando obter 198 mg.L<sup>-1</sup> CaCO<sub>3</sub> e pH 7,7±0,1, respectivamente.

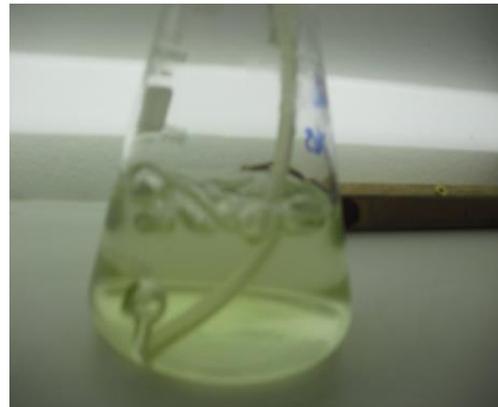
#### 4.5.2 Ambiente de Cultivo de *Daphnia magna*

Os espécimes de *Daphnia* foram cultivados em ambientes com luminosidade em torno de 1000 lux medidos com luxímetro e fotoperíodo de 12 h regulados com *timer*. Os recipientes eram fechados com parafilme e a temperatura da sala de cultivo ficou na faixa de 18 a 22 °C. O cultivo foi mantido coberto, evitando qualquer contaminação por agentes químicos presentes no ar, como os aerodispersóides (Figura 13).

Para a alimentação da *Daphnia magna* foram empregadas algas unicelulares. A cultura de algas foi mantida em meio enriquecido, como o meio CHU (ANEXO D). Na Figura 14 estão apresentadas culturas de algas *Desmodesmus subspicatus* empregada na alimentação de espécimes de *Daphnia*.



**Figura 13 - Foto da área cultivo dos cladóceros empregados (*Daphnia magna*).**  
**FONTE: Laboratório TECLAB**



**Figura 14 - Meio de cultivo em aerção de *D. subspicatus* utilizadas como alimento para *Daphnia magna*.**  
**FONTE: Laboratório TECLAB**

#### 4.5.3 Procedimentos para a Realização dos Testes com *Daphnia magna*

Para obtenção dos organismos-teste 24 horas antes do ensaio as fêmeas ovígeras foram separadas e transferidas para outro recipiente com meio de cultura fresco e depois da soltura dos neonatos os testes podem ser iniciados.

Antes do ensaio foram verificados os parâmetros de dureza da água a ser empregada nas diluições, pH e OD. Diariamente foi registrada a temperatura do ambiente, que deve ficar entre 18 e 22°C.

Para os bioensaios foram empregados béqueres de vidro com capacidade de 100 mL. Foram realizadas exposições de 20 indivíduos jovens de *Daphnia magna* no controle e nas diluições. Os organismos teste foram adicionados aos béqueres com auxílio de uma pipeta de Pasteur evitando a transferência de água, e por fim, diminuindo a probabilidade de diluição dos padrões preparados. Foram empregados organismos jovens de até 24 horas de idade, obtidos a partir de fêmeas com idade entre 10 e 60 dias.

Após a transferência dos organismos para cada béquer, esses recipientes de teste foram recobertos com filme de PVC e, em seguida, com papel alumínio. Para todos os testes, o período de incubação foi de 48 horas e os organismos permaneceram no escuro. Após 48h foi verificado efeito sobre a capacidade natatória dos organismos. Os ensaios foram realizados em duplicata.

O resumo das condições dos testes agudos com *Daphnia magna* está apresentado no ANEXO B.

#### 4.5.4 Teste de Sensibilidade para *Daphnia magna*

Foram realizados mensalmente testes de sensibilidade de acordo com as normas ABNT-NBR 12713/2009 e ISO 6341:1996 (USEPA, 1996).

Nos testes de sensibilidade foi utilizado dicromato de potássio reagente comercial como substância de referência com pureza de 99,9% ou superior e dentro da validade. Para a realização de cada controle foram realizados teste com concentrações variando de 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 e 0,6 mg.L<sup>-1</sup> de dicromato de potássio a fim de obter o valor de CE50.

#### 4.5.5 Teste de Volatilização nas Condições do Teste com *Daphnia magna*

Para realização dos testes de volatilização foi incubado uma solução de BTEX (mix) de 500 µg.L<sup>-1</sup>, de benzeno 150, 250 e 500 µg. L<sup>-1</sup> e de tolueno 150, 250 e de 500 µg. L<sup>-1</sup> nas mesmas condições que as amostras testes, sem adição de espécimes de *Daphnia*. Após 48 horas a concentração foi mensurada por cromatografia conforme descrito no item 4.4.

#### 4.5.6 Teste Exploratório para avaliação do efeito de benzeno não diluído em metanol sobre *Daphnia magna*

Concomitantemente aos ensaios de volatilização do benzeno, foi incluído mais um teste de toxicidade aguda sobre *Daphnia magna* utilizando o benzeno comercial. Para esse teste foi acrescentado aos béqueres de 100 mL contendo 20 espécimes de diferentes idades, aproximadamente 1 mL de benzeno comercial PA, sem a adição de metanol para observações do comportamento dos organismos.

Esse teste visa à observação do comportamento dessa espécie quando o ambiente ocorre uma degradação através do benzeno.

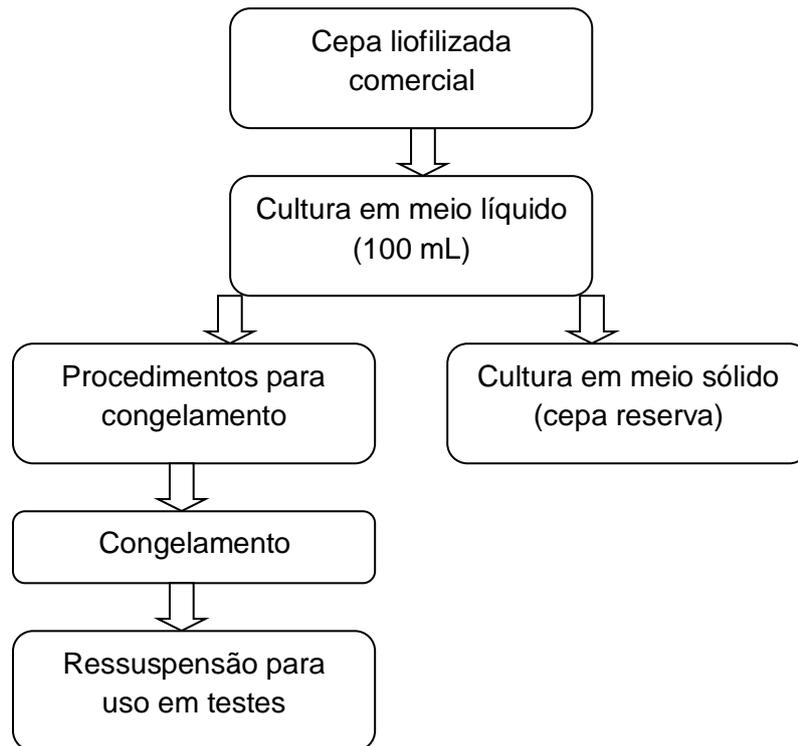
#### 4.6 ENSAIOS DE TOXICIDADE AGUDA EMPREGANDO *Vibrio fischeri*

A metodologia para o ensaio de *Vibrio fischeri empregada* foi a descrita na ABNT NBR 15411/2006 - Ecotoxicologia aquática - Determinação do efeito inibitório de amostras de água sobre a emissão de luz de *Vibrio fischeri* (ensaio de bactéria luminescente).

##### 4.6.1 Cultivo e Manutenção de *V. fischeri*

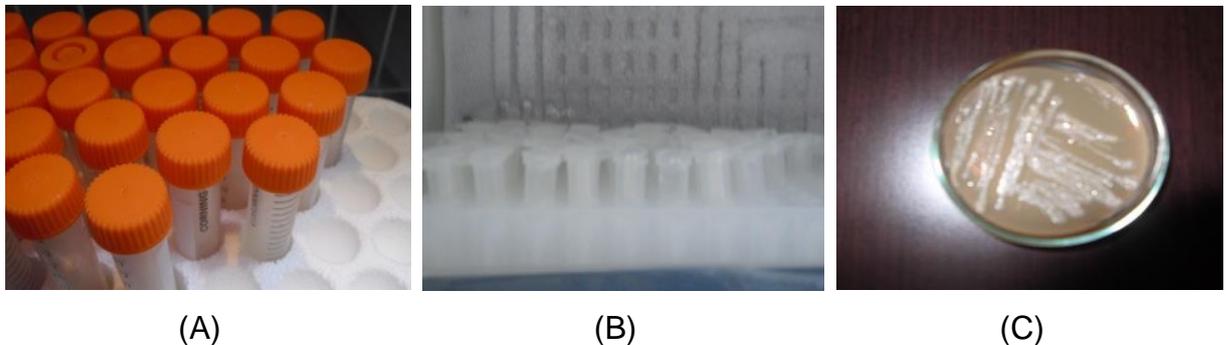
Como organismos-teste foram utilizados cepa da espécie *Vibrio fischeri* da linhagem NRRL B-11177 na forma congelada. As bactérias foram cultivadas inicialmente em meio de cultura líquido e seguindo o procedimento descrito na norma ABNT NBR 15411 (ABNT, 2006) foram congeladas e armazenadas em temperaturas abaixo de  $-18^{\circ}\text{C}$ . As cepas foram reconstituídas apenas no momento de uso. A composição do meio líquido de cultivo e a solução crioprotetora estão descritos no ANEXO C2.

A seqüência sucinta de preparação pode ser visualizada na Figura 15.



**Figura 15 – Fluxograma da sequência de preparação da cultura de *V.fischeri*.**

Na Figura 16 pode ser observado as bactérias congeladas e em meio sólido.



**Figura 16 - (A) Solução de reconstituição para cepa congelada. (B) Eppendorf contendo a bactéria congelada. (C) cepa em meio ágar-ágar.**

**FONTE:** Autor.

#### 4.6.2 Procedimentos para a Realização dos Testes com *Vibrio fischeri*

O princípio do teste é determinar a inibição da emissão da bioluminescência em culturas de *Vibrio fischeri* exposta por uma série de soluções testes.

O critério de avaliação do ensaio levou em conta o fator de correção que é a medida das alterações da luminescência do controle durante o período de exposição. O fator de correção deve estar entre 0,6 e 1,8. (ABNT, 2006).

De acordo com a norma ISO 11.348 (ISO, 2007) o pH deve ser conduzido com as características da amostra, porém em caso de extrema acidez ou alcalinidade, a norma ISO 15411 (ABNT, 2006) recomenda que o pH da amostra seja ajustado entre 6 a 8,5 com solução de ácido clorídrico ou hidróxido de sódio.

A medição de pH foi realizada antes do início do procedimento com pHmetro Digimed, calibrado com soluções de pH 4 e 7 da *Inorganic Ventures*, acreditado 17025/05 e ISO 34. Nas soluções testes não foram necessárias intervenções. A salinidade foi medida com refratômetro e as soluções necessitaram de adição da solução de cloreto de sódio ( $20 \text{ g.L}^{-1}$ ). O acréscimo da solução salina é necessário para que mantenha um ambiente estável para a *Vibrio fischeri* que é um organismo de vida marinha.

Foram utilizados para o ensaio 200  $\mu\text{L}$  da suspensão de bactérias, 200  $\mu\text{L}$  da solução de cloreto de sódio e 600  $\mu\text{L}$  das soluções preparadas de voláteis transferidas para os tubos reacionais incubados no termorreator à  $15^\circ \text{ C}$  (Figura 17) (ANBT, 2006).

Para a determinação da bioluminescência do teste foi utilizado equipamento Lumistox® Dr Lange300 (Figura 18).



**Figura 17 - Foto de amostras (ensaio com *Vibrio fischeri*) sendo colocadas nas cubetas do termobloco a  $15^\circ \text{ C}$ .  
FONTE: TECLAB**



**Figura 18 – Foto do Equipamento Lumistox® Dr Lange.  
FONTE: TECLAB**

#### 4.6.3 Teste de sensibilidade para *Vibrio fischeri*

Para aferir a sensibilidade dos organismos foram realizados testes de sensibilidade de acordo com as normas ISO 11348:1 (2007) e ABNT-NBR 15411/06. Nos testes de sensibilidade foi usada como substância de referência zinco ( $Zn^{2+}$ ), na forma de sulfato de zinco pentahidratado ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ) em concentrações variando de 1 a 3  $mg \cdot L^{-1}$  a fim de obter o CE50.

#### 4.6.4 Ensaio de Volatilização nas Condições do Teste com *Vibrio fischeri*

Para avaliar a possibilidade de perdas dos voláteis foram realizados testes empregando concentrações de 100  $\mu g \cdot L^{-1}$  de benzeno e 100  $\mu g \cdot L^{-1}$  de tolueno nas condições do teste, porém sem a cepas da bactéria *Vibrio fischeri*.

As soluções preparadas foram distribuídas nos tubos reacionais e deixadas no termobloco por 30 minutos. Após esse tempo as amostras foram transferidas para frascos de *Headspace*, sendo necessários 10 tubos para completar cada frasco *Headspace* (10 mL). Foram realizadas determinações cromatográficas para verificar a concentração final dos monoaromáticos nas amostras conforme item 4.4.

### 4.7 ENSAIOS TOXICIDADE CRÔNICA EMPREGANDO *Desmodesmus subspicatus*

A norma técnica utilizada como referência para realização dos testes de inibição do crescimento algal foi a ABNT 12648/2011 – Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica – Método de ensaio com algas (Chlorophyceae).

Para todos os ensaios com *Desmodesmus subspicatus* o efeito avaliado foi o crescimento/desenvolvimento, sendo o tempo de ensaio de 96 horas. O teste realizado sobre luminosidade acima de 4500 lux (medido através de luxímetro THAL 300) e mantido sobre agitação constante em mesa agitadora orbital “shaker” da Nova Ética. Um resumo das condições dos testes está apresentado no Anexo E. Em todos os testes foram utilizados como branco a água grau reagente Mili Q.

Os bioensaios foram realizados em ambiente com temperaturas entre 23 e 27° C monitoradas através de termômetros e as leituras se basearam na medição fluorimétrica de clorofila.

#### 4.7.1 Manutenção das Microalgas

A alga *Desmodesmus subspicatus* foi mantida em Meio CHU (ABNT, 2011) na sala de cultivo com fotoperíodo de 12 horas em luminosidade acima de 4500 lux.

O meio CHU foi preparado e autoclavado a 121°C por 20 minutos em erlenmeyer de 1000 mL e 2000 mL. Toda manipulação do meio CHU foi feita em fluxo laminar para evitar contaminações.

Os repiques das algas foram realizadas para garantir que 3 dias antes do ensaio o inóculo utilizado no ensaio estivesse entre  $10^4$  a  $10^5$  cel.mL<sup>-1</sup>.

Para ensaios medidos através da clorofila, pode ser realizada uma comparação entre clorofila x densidade de células algáceas conforme Figura 19.

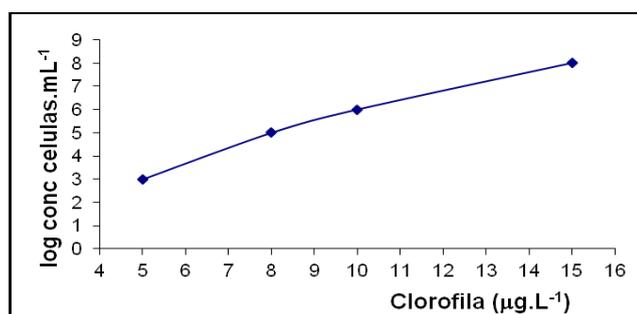


Figura 19 – Gráfico de valores de clorofila x densidade de células algáceas.

#### 4.7.2 Procedimentos para Realização dos Testes com *D. subspicatus*

Os recipientes de testes para o ensaio adotado foram erlenmeyers de 250 mL. Esses recipientes foram devidamente tampados com papel parafilm® evitando a evaporação dos solventes durante os ensaios e também foram ser preenchidos apenas até a metade.

Durante a incubação de 96 horas são agitados em mesa orbital entre 100 a 175 rpm.

Para os testes de toxicidade a solução nutriente foi preparada a partir de soluções estoques (Tabela 5), com ajuste de pH para  $8,0 \pm 0,5$  com soluções de ácido clorídrico ou hidróxido de sódio, autoclavado a 121° C por 15 minutos.

Depois de esfriar a solução nutriente era adicionado aproximadamente 3g de bicarbonato de sódio por litro de solução e promover aeração por 30 minutos. Essa solução é necessária para garantir a sobrevivência durante o período de incubação sendo adicionada no branco do teste e nas amostras testadas. (As soluções estoques para a convecção dessa solução nutriente podem ser visualizadas no anexo D).

**Tabela 5 – Solução nutriente preparada a partir da solução estoque de meios (valores a serem adicionados para preparar 1 litro).**

Solução-estoque	Volume
I	100mL
II	10mL
III	10mL
Bicarbonato de sódio	3g

As diluições foram feitas com os seguintes volumes: 80 mL da solução padrão de voláteis, 10 mL da solução nutriente contendo bicarbonato e 10 mL do inóculo. O controle negativo (branco) foi preparado com 80 mL de água purificada, 10 mL da solução contendo bicarbonato com nutrientes e 10 mL do inóculo.

Os erlenmeyer foram distribuídos de forma aleatória no shaker para minimizar eventuais diferenças espaciais de luminosidade e temperatura (Figura 21). Todos os recipientes foram vedados com parafilm. Durante o tempo do ensaio (96h) a temperatura ficou entre 24 a 26° C e a luminosidade mantida (média de 5.000 lux).

Nos testes de toxicidade crônica com *D. subspicatus* foi determinada à inibição do crescimento algáceo medido pela diferença de clorofila inicial e final em relação aos valores médios do branco. As medidas foram realizadas no início do teste e após 96 horas. A fluorescência de clorofila *in vivo* é medida no fluorímetro em comprimento de onda de 685 nm, sendo a cubeta utilizada própria para o equipamento. O fluorímetro utilizado foi o Aquacfluor Turner (Figura 22).



**Figura 20** – Agitador orbital com as amostras para Ensaio com a alga *Desmodesmus subspicatus*.

**FONTE:** TECLAB



**Figura 21** - Foto fluorímetro durante uso para o ensaio.

**FONTE:** TECLAB

#### 4.7.3 Teste de Sensibilidade para *Desmodesmus subspicatus*

Foram realizados mensalmente ensaios de sensibilidade para aferir a sensibilidade dos organismos. A substância de referência utilizada foi o sulfato de cobre penta-hidratado e para compor a carta-controle, soluções de concentrações entre 0,5 e 3 mg.L<sup>-1</sup> foram realizadas a fim de obter o CI50.

#### 4.7.4 Volatização nas Condições do Teste com *Desmodesmus subspicatus*

Foram incubadas soluções de hidrocarbonetos monoaromáticos (benzeno e tolueno em metanol) de concentrações selecionadas nas mesmas condições do teste de toxicidade crônica onde o inóculo de alga foi substituído para água grau MiliQ. Após 96 horas, a concentração dos monoaromáticos foi mensurada por cromatografia conforme item 4.4.

### 4.8 GARANTIA DE QUALIDADE

O controle de qualidade nos ensaios ecotoxicológicos tem grande importância para assegurar a garantia dos resultados e da sensibilidade dos organismos.

Alguns fatores ambientais podem ser facilmente controlados, tais como temperatura e regimes de iluminação (RATTE *et al.*, 2003).

O garantia da qualidade do ensaio em ecotoxicologia leva em conta a correta limpeza correta de vidrarias, da verificação da água purificada utilizada para as soluções, da água de cultivo, cartas controle dos testes de sensibilidade, o controle de temperatura com fotoperíodo correto.

Para os ensaios foram empregados termômetros, luxímetros, vidrarias volumétricas, balanças, pesos padrões de calibração de balanças e micropipetas todos calibrados na RBC. As micropipetas utilizadas para transferência de volumes também são verificadas periodicamente para avaliar a estabilidade entre as calibrações.

Para *Daphnia magna* a solução de biotina utilizada do meio de cultivo foi estocada em freezer também controlada com termômetro calibrado na RBC. Para garantir a correta execução dos ensaios com *Daphnia magna* é fundamental manter as condições previstas nas normas, pois condições desfavoráveis, tais como variação fora do limite de temperatura, mudanças do fotoperíodo, excesso ou falta de alimento e superpopulação, interferem na reprodução favorecendo, muitas vezes o aparecimento de machos e conseqüentemente efípios. Foram garantidos durante o ensaios a dureza da água, oxigênio dissolvido, e pH sendo medidos através de pHmetro calibrado na RBC, oxímetro calibrado nível operador e fitas indicativas de dureza e controle por titulação por compleximetria conforme APHA (2012).

Todo ambiente do laboratório foi mantido isento de odores (perfumes), soluções desinfetantes. Para evitar contaminação cruzada os materiais incluindo toda vidraria e reagentes eram de uso exclusivo do setor de ecotoxicologia.

Esses mesmos cuidados foram seguidos durante a manipulação dos organismos, evitando inclusive o uso de qualquer tipo de maquiagens, perfumes ou outros aerodispersóides. O uso de jaleco limpo e toucas foram obrigatórios, bem como a higiene das mãos e limpeza dos pés.

Para o ensaio com bactérias luminescentes *Vibrio fischeri* foram levados em conta os mesmos cuidados básicos com a higiene, limpeza, segregação e controle de acordo com os procedimentos citados no ensaio de *Daphnia magna*. Os meios e soluções dos ensaios que necessitam ser autoclavados, o nanômetro que controla a pressão e temperatura é calibrado na RBC. As manipulações das bactérias para estocagem em meio protetor de congelamento foram realizados em fluxo laminar.

O branco (controle negativo) foi empregado a cada rodada de teste, sendo o mesmo utilizado para compor os cálculos finais.

Para o ensaio com algas *Desmodesmus subspicatus* foram considerados os mesmos cuidados básicos com a higiene, limpeza, segregação e controle de acordo com os procedimentos citados no ensaio de *Daphnia magna*.

Todas as soluções do meio de cultivo utilizados no ensaio foram autoclavados e toda manipulação das algas foram realizadas em fluxo laminar para evitar as contaminações com fungos.

O cultivo de algas foi verificado ao microscópio óptico a cada repicagem evitando, por exemplo, fungos observados pela presença de esporos, também visualizado células algáceas deformadas, ou contaminações por outras espécies. Estoques de algas em meio sólido são importantes para repor quando necessário novos lotes em meio líquido.

A garantia dos ensaios também foi assegurada empregando controles do branco (controle negativo) sendo que no final do teste o valor do branco deve ser 16 vezes maior (em número de células de algas em 72 horas) e a variação entre as replicatas não deve exceder a 20%.

A garantia da qualidade do ensaio de BTEX leva em conta a correta limpeza de vidrarias e também a segregação de todos os materiais do laboratório, incluindo micropipetas, reagentes e vidrarias.

Os padrões utilizados para a calibração dos instrumentos são acreditados pela NBR ISO 17025 e/ou ISO 34 que são a garantia da qualidade dos materiais e reagentes, mais conhecidos através do vocabulário VIM (vocabulário internacional de metrologia) como materiais de referência certificados - MRC.

Outra forma de garantia da qualidade foi a participação em ensaios interlaboratoriais realizados em provedores de proficiência acreditados pelo CGGRE/INMETRO ou por outro órgão de reconhecimento mútuo.

Durante o período de realização deste estudo, a autora como responsável técnica da TECLAB, participou de um interlaboratorial com a Rede Metrológica do Rio Grande do Sul para o ensaio de BTEX, sendo que todos os resultados do laboratório Teclab ficaram 100% conformes, com o grau máximo de excelência nesse parâmetro.

Também foram realizados rigorosos controles de qualidade, por exemplo, branco de transporte de amostras, brancos de campos, duplicadas de amostras e fortificações, pois o ensaio de BTEX no laboratório Teclab é acreditado NBR ISO 17025/2005, sendo obrigatório controle de qualidade devido aos requisitos estabelecidos pelos procedimentos da CGCRE como, por exemplo, o NIT. DICLA. 057 e outros disponíveis no site do INMETRO.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 TOXICIDADE DO METANOL

Para definir o limite de adição de metanol que não causa efeito deletério aos organismos testados e visando a solubilização das soluções de benzeno e tolueno foi realizado estudo preliminar empregando o microcrustáceo *Daphnia magna*, a bactéria *Vibrio fischeri* e a alga *Desmodesmus subspicatus*. Os resultados mostraram que em concentrações de até 100 mg.L<sup>-1</sup> o metanol não influencia nos testes, o que está de acordo com Hutchinson *et al.* (2006) que estabeleceram um limite de 79,2 mg.L<sup>-1</sup>.

### 5.2 PRESENÇA DE METANOL NAS SOLUÇÕES DE BTEX-MIX E NAS SOLUÇÕES PREPARADAS

O padrão de BTEX-mix adquirido comercialmente contém metanol para promover a solubilidade dos solventes; no entanto, não há informação sobre sua concentração. Para estimar a faixa de concentração de foi realizado estudo do padrão BTEX-mix por cromatografia gasosa e os valores de área obtidos foram comparados com valores de áreas de metanol (média de três determinações) (Tabela 6). Com os resultados obtidos foi possível estimar que a concentração de metanol em BTEX-mix está entre 10 e 50 mg.L<sup>-1</sup>.

**Tabela 6 – Valores de área cromatográfica relacionada com concentrações de BTEX-Mix e de metanol em soluções aquosas.**

Solução aquosa	Concentração nominal	Área cromatográfica metanol (valor médio)	Desvio Padrão	Curva de referência metanol
BTEX-mix com metanol (µg.L <sup>-1</sup> )	1500	5.810,33	513,16	
Solução conhecida	100	18.139,26	1154,71	y = 0,0052x - 4,48 R <sup>2</sup> = 0,9178
Metanol	50	13.276,25	388,67	
(mg.L <sup>-1</sup> )	10	1.945,26	103,32	

Para a solubilização dos hidrocarbonetos empregados neste trabalho (benzeno, tolueno) foi empregado metanol. Essas soluções foram estudadas empregando cromatografia CG/FID e de acordo com dados obtidos é possível confirmar que a concentração de metanol presente nas soluções preparadas (Tabela 7) foi inferior a 100 mg.L<sup>-1</sup> para as maiores concentrações de solução estoque empregadas.

**Tabela 7 - Valores de área cromatográfica relacionada com concentrações de benzeno, tolueno e metanol em soluções aquosas.**

Solução aquosa	Concentração nominal	Área cromatográfica metanol ( valor médio)	Desvios	Curva de referência metanol
Benzeno (µg.L <sup>-1</sup> )	1000	17.820,63	505,90	y = 0,0051x - 3,6581 R <sup>2</sup> = 0,9313
Tolueno (µg.L <sup>-1</sup> )	1000	17.009,55	90,18	
Metanol (mg.L <sup>-1</sup> )	100	18.139,26	1154,71	
	50	13.276,25	288,67	
	1	145,26	103,32	

### 5.3 INTERFERENTES NA MATRIZ

Os resultados dos testes cromatográficos, realizados empregando cromatografia (CG/MS), do “*spike*” apresentaram recuperações entre 95 a 110%, conforme Standard Methods (2012) valores em conformidade se encontram entre 80 a 120% de recuperações. Esse teste demonstra que os meios avaliados (meio M4, meio CHU, pré-cultura, soluções de *Vibrio fischeri*) não apresentaram interferência na recuperação dos hidrocarbonetos monoaromáticos.

### 5.4 ENSAIOS EMPREGANDO *Daphnia magna*

#### 5.4.1 Carta de Sensibilidade

A Carta de Sensibilidade preparada a partir dos registros da avaliação da sensibilidade da *Daphnia magna* está apresentada na Figura 22.

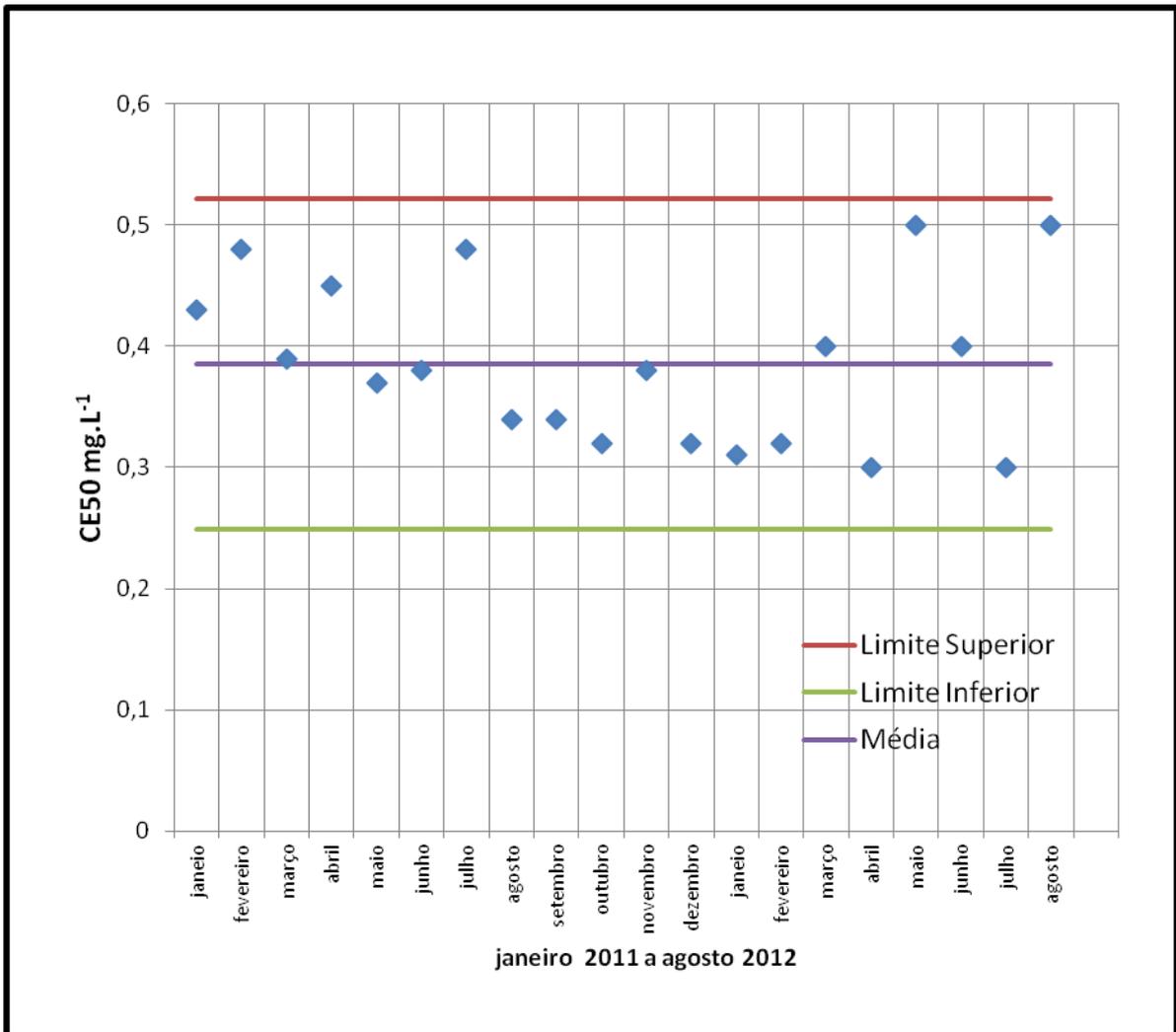


Figura 22 – Carta de sensibilidade de *Daphnia magna* empregando dicromato de potássio.

Analisando a figura acima, observa-se que na carta controle não ocorreu dados tendenciosos (sete dados abaixo ou acima da linha média) e os valores se encontram entre o desvio máximo aceitável (dois desvios padrões). Dessa forma o organismo utilizado mostrou-se sensível a substância de referência viabilizando o estudo.

Além da carta de sensibilidade durante toda a realização do estudo não foi encontrado aparecimento de machos ou efípios, que são ovos de resistência que indicam que as culturas não estão em boas condições.

5.4.2 Volatilização de Monoaromáticos nas Condições Teste com *D. magna*

Nas Tabelas 8, 9 e 10 estão apresentados os resultados da determinação de volatilidade de solução aquosa de BTEX-Mix, benzeno e tolueno em metanol. Os testes foram realizados em condições semelhantes ao teste com *D. magna* e os desvios foram calculados com base na incerteza expandida do método (ANEXO H).

**Tabela 8 – Resultados de determinações de concentração de solução aquosa de BTEX-Mix em metanol. Valores iniciais e após 48h em condições semelhantes ao teste com *D.magna*.**

Parâmetro	Substância	Concentração	Concentração	Redução (%)
		Inicial ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	Final ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	
Branco	-	< 1	< 1	-
BTEX-Mix 2	Benzeno	250±1,9	247 ± 1,8	1,2 ±0,9
	Tolueno	250±2,3	246 ± 2,3	1,6 ±1,4
	Etilbenzeno	250±2,4	240 ± 2,4	4 ±3,9
	M,p xilenos	250±2,2	243 ± 2,1	2,8 ±2,4
	O xileno	250±16,2	241 ± 15,7	3,6 ±2,3
BTEX-Mix	Benzeno	500±1,3	489,0± 3,6	2,2 ±1,6
	Tolueno	500±4,6	487,2± 4,5	2,6 ±2,3
	Etilbenzeno	500±4,8	490,0± 4,8	2,0 ±1,9
	M,p xilenos	500±4,4	491,9± 4,3	1,6±1,4
	O xileno	500±32,4	481,6± 31,3	3,7 ±2,4

**Tabela 9 - Resultados de determinações de concentrações de solução aquosa de benzeno em metanol. Valores iniciais e após 48h em condições semelhantes ao teste com *D.magna*.**

Concentração da amostra preparada ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	benzeno inicial ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	benzeno final ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	Redução de benzeno (%)
Branco	<1,0	<1,0	-
150	150 ±1,1	143 ± 1,1	4,7±3,5
250	250± 1,9	244±1,8	2,4±1,9
500	500 ±3,7	489 ± 3,6	2,2±1,6

**Tabela 10 - Resultados de determinações de concentrações de solução aquosa de tolueno em metanol. Valores iniciais e após 48h em condições semelhantes ao teste com *D.magna*.**

Concentração da amostra preparada ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	tolueno inicial ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	tolueno final ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	Redução de tolueno (%)
Branco	<1,0	<1,0	-
150	150 ±1,4	148 ± 1,3	1,7±16
250	250± 2,3	246±2,3	1,7±1,5
500	500 ±4,6	488 ± 4,5	2,3±2,1

De acordo com os resultados dos testes realizados se verifica que ocorreu volatilização entre 1,2 e 4,7%. Pelos testes realizados nas condições similares ao teste com *D. magna* as perdas por volatilização foram desprezíveis.

Nos testes com *D. magna* os recipientes de teste (copo de Béquier de 100 mL) foram cobertos com parafilm® e, uma vez que estavam completamente preenchidos (volume das amostras igual a 100 mL) ficaram praticamente sem espaço livre o que, provavelmente, dificultou a ocorrência de *headspace*.

#### 5.4.3 Ensaios de Toxicidade de Soluções Aquosas do BTEX-Mix em Metanol

Os resultados obtidos para os ensaios preliminares com as concentrações de 25 a 400  $\mu\text{g.L}^{-1}$  não induziram toxicidade para o microcrustáceo *Daphnia magna* (Figura 23). Ocorreu imobilidade de 15% e 100% dos organismos para as amostras com concentrações de 1000 e 1500  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , respectivamente.

Empregando o método TSK foi calculado a CE50, com limite de confiança de 95%, sendo  $\text{EC}_{50} = 1.109,16 \mu\text{g.L}^{-1}$ ; limite de confiança inferior = 998,07  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ; limite de confiança superior = 1232,61  $\mu\text{g.L}^{-1}$ .

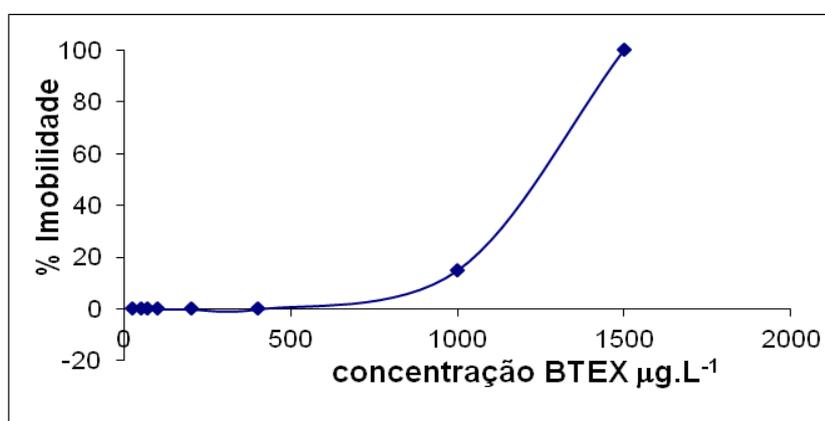


Figura 23 - Curva de concentração - resposta do ensaio de toxicidade aguda (48h) com *Daphnia magna* para solução aquosa contendo BTEX teste preliminar com concentrações de de 25, 50, 75, 100, 150, 200, 400, 1000 e 1500  $\mu\text{g.L}^{-1}$ .

Com o objetivo de estabelecer uma curva com menor desvio foram realizados ensaios com concentrações variando de 800 a 1500  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . Da mesma forma que no teste preliminar, a partir de 1000  $\mu\text{g.L}^{-1}$  houve resposta do organismo teste e a faixa de sensibilidade está compreendida entre 1000 a 1500  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . Valores abaixo de 1000  $\mu\text{g.L}^{-1}$  não induzem toxicidade e valores acima de 1500  $\mu\text{g.L}^{-1}$  promoveram incapacidade natatória para todos os organismos testados (Tabela 11).

**Tabela 11 – Valores obtidos com teste de toxicidade da *Daphnia magna* frente à BTEX.**

<b>BTEX (<math>\mu\text{g.L}^{-1}</math>)</b>	<b>Imobilidade (%)</b>	<b>Desvio padrão (%)</b>
<b>Branco</b>	0	0
<b>800</b>	0	0
<b>900</b>	0	0
<b>1000</b>	12,5	3,5
<b>1100</b>	30	0
<b>1200</b>	47,5	3,5
<b>1300</b>	70	$\pm 0$
<b>1500</b>	100	$\pm 0$

Empregando o método TSK foi calculado a CE50, com limite de confiança de 95%, sendo EC50 = 1.187,27  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ; limite de confiança inferior = 1.142,4  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ; limite de confiança superior = 1.233,79  $\mu\text{g.L}^{-1}$ .

Interessante observar que embora no teste preliminar apenas dois valores empregados apresentassem toxicidade, o cálculo empregado o método TSK permitiu estimar valor de CE50 (1.109,16  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) próximo ao teste definitivo (1.187,27  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) o que está de acordo com Aragão; Araújo, (2008) que afirmam que valores de concentrações efetivas e letais calculadas em relação a 50% dos organismos proporcionam respostas mais reprodutíveis pois estão na região central da curva concentração-resposta e livre das incertezas do efeito significativo do efeito observado.

Valores de 1000  $\mu\text{g.L}^{-1}$  BTEX são necessários para produzir efeitos tóxicos agudos em organismos tais como algas, dafinídeos e peixes o que está de acordo com o valor obtido (CE50) dos testes realizados com *Daphnia magna* de 1.187,27  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (US EPA, 2010).

Headley *et al.* (2001) verificaram que somente em concentrações de BTEX maiores de 5 mg.L<sup>-1</sup> induziram toxicidade para *Daphnia magna*.

O Departamento ambiental de Massachusetts (2007) publicou em sua tabela ES-1 que o valor crônico de compostos na fração C6-C8 são de CL50 = 1.191 µg.L<sup>-1</sup> para um Log K<sub>ow</sub> de 2,82. Comparando com o quadro 1 todos os compostos BTEX contém 6 carbonos e a média do Log K<sub>ow</sub> está próximo de 2,8 e o resultado obtido para o teste agudo foi muito próximo ao tabelado desse departamento ambiental.

#### 5.4.4 Ensaio de Toxicidade de Soluções Aquosas de Benzeno em Metanol

No teste preliminar os resultados indicaram que as amostras de benzeno de 10 µg.L<sup>-1</sup> não apresentaram toxicidade enquanto que para as amostras com concentração de 100 µg.L<sup>-1</sup> houve imobilização de 80% dos organismos (Tabela 12).

**Tabela 12 - Dados obtidos com teste preliminar de toxicidade da *Daphnia magna* frente ao benzeno.**

Benzeno (µg.L <sup>-1</sup> )	Imobilidade (%)	Desvio padrão (%)
Branco	0	0
10	0	0
100	80	0
1000	87,5	±7
10000	100	±0
100000	100	±0

Pelo teste realizado em 100 µg.L<sup>-1</sup> representou uma imobilidade maior que 50%, portanto, o teste definitivo foi preparado na faixa de concentração 50 a 350 µg.L<sup>-1</sup>, visando maior precisão para o valor de CE50.

No teste definitivo com concentrações de 50 a 350 µg.L<sup>-1</sup> foi observado que um pequeno acréscimo no valor da concentração que proporcionava um rápido aumento na porcentagem de indivíduos imóveis, demonstrando uma resposta mais intensa do agente tóxico (Tabela 13, Figura 24).

Tabela 13 - Dados obtidos com teste final de *Daphnia magna* com benzeno.

Benzeno ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	Imobilidade (%)	Desvio padrão (%)
Branco	0	0
50	10	$\pm 0$
70	45	$\pm 0$
100	85	$\pm 0$
150	95	$\pm 0$
250	100	$\pm 0$
350	100	$\pm 0$

Empregando o método TSK versão 1.5 foi calculada a CE50 para os valores obtidos nos testes CE50:  $73,23 \mu\text{g.L}^{-1}$ , limite de confiança inferior =  $64,79 \mu\text{g.L}^{-1}$ ; e limite de confiança superior =  $81,62 \mu\text{g.L}^{-1}$ .

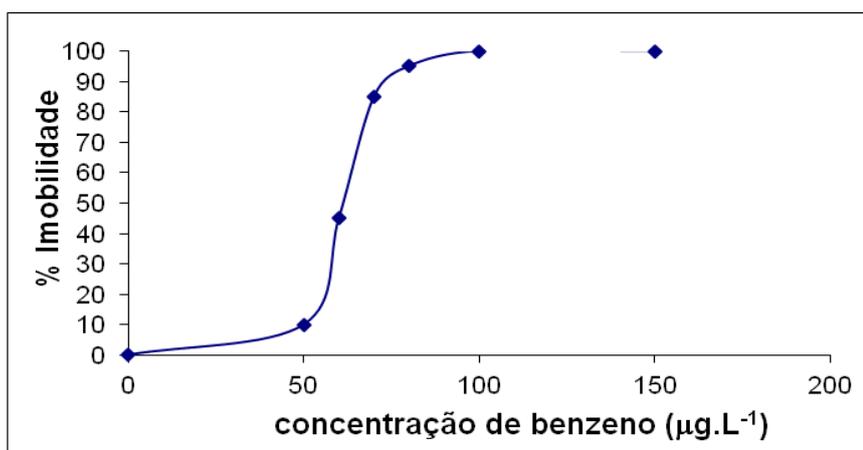


Figura 24 - Curva de concentração – resposta do ensaio de toxicidade aguda (48h) com *Daphnia magna* para solução aquosa de benzeno em metanol (concentrações de 50, 70, 100, 150 e 250  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ).

Vieira (2004) estudou a toxicidade aguda do benzeno sobre o microcrustáceo marinho *Metamysidopsis elongata atlântica*. O resultado da CL50 (48h) para benzeno foi  $95,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ , próximo do valor encontrado neste trabalho mesmo sendo um bioindicador marinho e comparação com a *Daphnia magna* de água doce.

Cientistas como LeBlanc (1980), Eatmond; Booth; Lee (1984), MacLean e Doe, (1989), Canton e Adema (1978) realizaram estudo com *Daphnia magna* utilizando o benzeno como agente tóxico.

Canton e Adema (1978) utilizaram *Daphnia magna* empregando um método holandês de 1978 (*Daphnia magna* as test organism in acute and chronic toxicity experiments). Nesse método os espécimes de daphnias eram avaliados por tamanho (sem citar a questão de idade). Os resultados de CL50 foram 400 mg.L<sup>-1</sup>, 305 mg.L<sup>-1</sup> e 373 mg.L<sup>-1</sup> para *Daphnia magna*, *Daphnia pulex* e *Daphnia cucullata*, respectivamente.

LeBlanc (1980) realizou estudos com *Daphnia magna* utilizando o método *Methods for acute toxicity tests with fish, macroinvertebrates, and amphibians*, com o uso de trietilenoglicol, etanol e acetona para solubilizar o benzeno. Em seus testes usou 15 espécimes de *Daphnia* para 2 litros de solução teste e na metodologia atual é utilizado 20 espécimes para 100 mL de solução teste.

Os valores de CL50 determinados nesses estudos estão muito acima dos encontrados atualmente. Acredita-se que isso ocorra principalmente pela evolução das metodologias e das garantias dos requisitos de competência e qualidade, representados, por exemplo, pelas normas NBR ISO IEC 17025: 2001, revisada em 2005.

#### 5.4.5 Ensaio de Toxicidade de Soluções Aquosas do Tolueno em Metanol

Para tolueno o teste preliminar foi realizado com concentrações entre 10 a 200 µg.L<sup>-1</sup>. Valores de até 50 µg.L<sup>-1</sup> não provocaram imobilidade nos organismos e para valores iguais ou superiores a 150 µg.L<sup>-1</sup> ocorreu imobilidade em 95-100% dos organismos testados (Tabela 14).

**Tabela 14 – Valores obtidos do teste de toxicidade da *Daphnia magna* frente ao tolueno.**

Tolueno (µg.L <sup>-1</sup> )	Imobilidade valor médio (%)	Desvio padrão
Branco	0	0
10	0	0
50	10	0
100	67,5	3,5
150	92,5	3,5
170	100	0
200	100	0

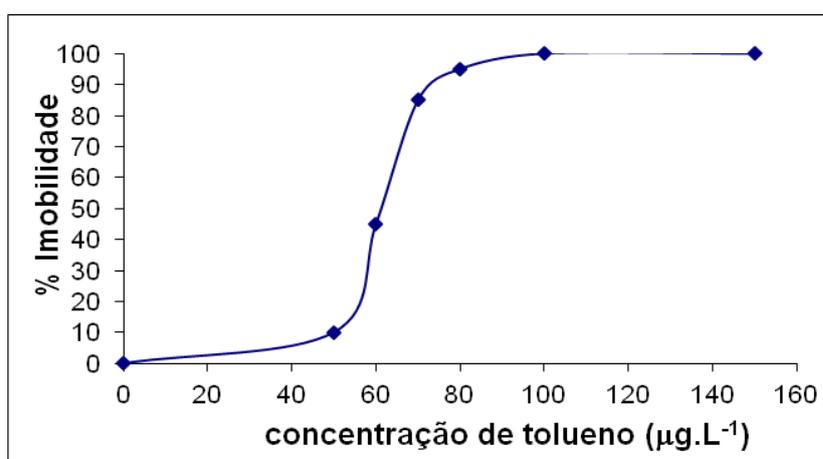
Empregando o método TSK foi calculado a CE50, com limite de confiança de 95% sendo  $EC_{50} = 75,30 \mu\text{g.L}^{-1}$  e limite de confiança inferior =  $62,09 \mu\text{g.L}^{-1}$ ; limite de confiança superior =  $91,32 \mu\text{g.L}^{-1}$ .

No teste definitivo foi empregado concentrações de 50 a 150  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . Os resultados estão na Tabela 15 e na Figura 26.

**Tabela 15 – Valores obtidos do teste final de toxicidade da *Daphnia magna* frente ao tolueno.**

Tolueno ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	Imobilidade (valor médio) (%)	Desvio padrão
Branco	0	0
50	0	0
60	10	0
70	40	3,5
80	55	3,5
100	75	3,5
150	95	0

Empregando o método TSK foi calculado a CE50, com limite de confiança de 95% sendo  $EC_{50} = 81,58 \mu\text{g.L}^{-1}$  e limite de confiança inferior =  $74,32 \mu\text{g.L}^{-1}$ ; limite de confiança superior =  $89,56 \mu\text{g.L}^{-1}$ .



**Figura 25 - Curva de concentração – resposta do ensaio de toxicidade aguda (48h) com *Daphnia magna* para solução aquosa de tolueno em metanol (concentrações de 50, 60, 70, 80, 100 e 250  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ).**

De acordo com NAGPAL (2007) “para proteger a vida aquática de água doce, a concentração máxima de tolueno não deve ser superior a  $0,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ ; no entanto, mais o usual devido a diversas dificuldades no contexto global, financeiro e político é a utilização de valores maiores”.

Tosato et al. (1993) testaram soluções aquosas de tolueno com *Daphnia magna* e os valores de CL50(48h) referente ao tolueno foram em média  $33,4 \mu\text{g.L}^{-1}$  e  $30,8 \mu\text{g.L}^{-1}$ . A diferença com os valores obtidos neste trabalho pode estar relacionada com diferenças de metodologia. No relato dos autores, por exemplo, não consta que eles tenham realizado a solubilização do tolueno para preparar as soluções empregadas.

Black et al. (1982) estudaram o tolueno e determinaram o CL50 (9 dias) utilizando o *Rana pipiens* e encontraram o valor de  $390 \mu\text{g.L}^{-1}$ . Também continuaram estudos de morfologia de ovos de *Oncorhynchus mykiss* e acima de  $5 \mu\text{g.L}^{-1}$  verificaram que 1% dos ovos ficaram deformados. Determinaram também o CE50 com o efeito observado de deformação e teratogênese encontrando o valor de  $16 \mu\text{g.L}^{-1}$ .

Neste estudo a *Daphnia magna* foi considerada um ótimo organismo teste manipulação em laboratório, além do tamanho dos neonatos não necessitando grande acurácia visual do analista em comparado, por exemplo, com a *Ceriodaphnia dubia*, reduz erros analíticos. Além desse fator, a reprodução é muito eficiente e em poucos dias novas populações já estão prontas para um novo teste.

#### 5.4.6 Resultados Obtidos em Comparação aos Valores Citados em Normas

##### 5.4.6.1. Comparativo com CE50

Na Tabela 16 estão apresentados os valores (resumo) de CE50 obtidos nos ensaios definitivos com *Daphnia magna*. Os valores serão comparados com os dados normativos encontrados no Quadro 25.

**Tabela 16 – Valores de CE50 obtidos dos testes de BTEX, benzeno e tolueno dos testes realizados com *Daphnia magna*.**

	<b>BTEX (<math>\mu\text{g.L}^{-1}</math>)</b>	<b>Benzeno (<math>\mu\text{g.L}^{-1}</math>)</b>	<b>Tolueno (<math>\mu\text{g.L}^{-1}</math>)</b>
CE50	1187,27	73,23	81,58
Limite de confiança inferior	1142,04	64,49	74,32
Limite de confiança superior	1233,79	81,62	89,56

Comparando os resultados obtidos nos testes com BTEX, benzeno e tolueno, observamos que as soluções de benzeno e tolueno apresentaram maior toxicidade quando isolados do que em misturas, ocorrendo o antagonismo.

Realizando a soma dos compostos monoaromáticos BTEX das normas estudadas, para fins apenas de comparação, é possível observar que a Lista Holandesa foi o valor que mais se aproximou do limite de intervenção (recomendado a remediação de áreas contaminadas) de  $1.250 \mu\text{g.L}^{-1}$  do CE50 obtido nos testes. O valor de alerta de  $625 \mu\text{g.L}^{-1}$  também está bem estabelecido, e é muito próximo da metade do CE50 encontrado.

Para valores da CETESB 2005, Decreto 1190/04 valores industriais e do CONAMA 420/2009 o valor máximo permitido ( $1.505 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) está acima do valor encontrado do CE50, o que pode ocasionar impactos ambientais significativos.

Para consumo humano tanto o CONAMA 396/2008 quanto a Portaria N. 2914/2011 permitem valores de tolueno maiores aos encontrados nesse estudo.

Para classes de água conforme o CONAMA 357/2005 os valores de CE50 desse estudo são aproximadamente 3 vezes maior que o previsto nessa legislação o que garante o princípio de prevenir a contaminação da Política Nacional de Meio Ambiente.

Para valores de descarte de efluentes conforme CONAMA 430/2011, o CE50 obtido está 4 vezes abaixo do valor normativo, portanto, o descarte de efluentes em concentrações acima de  $1.187 \mu\text{g.L}^{-1}$  pode gerar impacto significativo a 50% dos dafinídeos e valores de  $4.840 \mu\text{g.L}^{-1}$  proporcionam impacto em 100% dos organismos. Salientando que o valor normativo também é baseado no fator de dispersão no corpo aquático, conforme obrigatoriedade do empreendimento de apresentar ao órgão ambiental o estudo de capacidade do corpo receptor. Da mesma forma ocorre para as demais substâncias orgânicas testadas.

COMPOSTOS	Lista Holandesa 6530-3 $\mu\text{g.L}^{-1}$		Decreto 1190/04 $\mu\text{g.L}^{-1}$		CET. 195/05 $\mu\text{g.L}^{-1}$	CONAMA 396/2008 $\mu\text{g.L}^{-1}$				CONAMA 420 /09 $\mu\text{g.L}^{-1}$	CONAMA 430/11 $\text{mg.L}^{-1}$	PORTARIA 2914/2011 $\mu\text{g.L}^{-1}$	CONAMA 357/2005: AGUAS DOCES $\mu\text{g.L}^{-1}$			
	T	I	R/A /C/ S	Ind.		CH	DA	Irrigaç ão	Recreaç ão				Água Subterrân ea	Efluentes	Água para consumo	C1
Benzeno	15	30	5	30	5	5	---	---	10	5	1,2	5	5	5	5	NC
Tolueno	500	1000	170	1000	300	170	24	---	---	300	1,2	170	2,0	2,0	NC	NC
Etilbenzeno	75	150	150	200	700	200	---	---	---	700	0,84	200	90,0	90,0	NC	NC
Xilenos	35	70	70	300	500	300	---	---	---	500	1,6	300	300,0	300,0	NC	NC
Valor CE50 BTEX - estudo realizado com <i>Daphnia magna</i>									1.187,27 $\mu\text{g.L}^{-1}$							
Valor CE50 benzeno - estudo realizado com <i>Daphnia magna</i>									73,23 $\mu\text{g.L}^{-1}$							
Valor CE50 tolueno - estudo realizado com <i>Daphnia magna</i>									81,58 $\mu\text{g.L}^{-1}$							

NC: Não consta      DA: Dessedentação de Animais      C = Classe      Ind.: Industrial      I: valor de intervenção      T: valor de alerta  
R/A/C/S: RES/APA/Com/serv (Residencial/área de proteção ambiental, comércio e serviços).      CET: CETES      CH: consumo humano

**Quadro 25 - Quadro resumo de Valores de Referência de diversas normas relacionados com hidrocarbonetos monoaromáticos**

O Canadá já utiliza os ensaios de ecotoxicologia em seus valores de referencia conforme guia *Environment Canada* (1990) usando *Ceriodaphnia dubia*, *Daphnia magna*, *Pimephales promelas*, *Vibrio fischeri*, *P. subcaptata*, *Pseudomonas putida* e *V. Spirillum*, zooplâncton rotífero *Brachionus rubens*, peixe *Oncarhynchus mykiss*.

O benzeno conforme ACGIH (2000, 2003) é uma das substâncias mais tóxicas catalogadas e hoje no Brasil inclusive está proibido seu uso no ambiente de trabalho devido seu potencial carcinogênico.

De acordo com a Lista Holandesa e Decreto 1190/04 valores acima de 30  $\mu\text{g.L}^{-1}$  em ambientes, necessitam de intervenções para recuperação dessas áreas degradadas o que demonstra conformidade com os dados obtidos.

Realizando a soma dos compostos monoaromáticos BTEX das normas estudadas conseguimos observar que a norma dos EUA e do Canadá estão mais restritivas e com valores abaixo do valor do CE50 encontrado. As normas dos EUA que usam o critério de risco e proteção e os valores da Holanda estão bem próximas com o valor CE50.

Para o benzeno, todas as normas citadas (Quadro 26) estão em conformidade com os resultados do CE50 obtido nos ensaios laboratoriais.

Pelo quadro 20, notamos que o valor da Alemanha é menor em comparado com o Brasil, Canadá e EUA, mais não consta valor máximo para tolueno.

Em relação ao tolueno, comparando o valor obtido do CE50 com os valores de alerta e intervenção da lista holandesa, da CETESB 2005, do CONAMA 420/2009 notamos que o tolueno foi à substância que mais discordou dos valores normativos sendo que apenas as normas do CONAMA 357/05 e valores de dessedimentação do CONAMA 396/08 que coincidem com dados encontrados.

Para consumo de água o valor máximo permitido de 200  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , estando aproximadamente duas vezes maior que o CE50 encontrado. Os valores máximos das legislações para consumo se baseiam no fator do risco e em comparações com organismos com taxionomia mais próximos aos humanos como coelhos e ratos, visualizado nas fichas de informações de produtos químicos, por exemplo, FISPQ-15 da Petrovila (2007) o valor do DL50 é de 5000  $\text{mg.kg}^{-1}$ , e pela ficha BR600 o valor do CL50 é de 636 ppm da Petrobrás (2011).

Pelos testes realizados concentrações acima de  $50 \mu\text{g.L}^{-1}$  já promovem algum efeito aos organismos testados e pelos valores máximos das classes de água doce do CONAMA 357/05 de  $2 \mu\text{g.L}^{-1}$  estão 40 vezes abaixo do encontrado, assim podemos concluir que, para águas superficiais no Brasil ocorre a proteção a flora e fauna aquática.

Comparando o valor obtido do CE50 e o valor máximo permitido de tolueno para potabilidade no EUA de  $40 \mu\text{g.L}^{-1}$  demonstra que o valor está abaixo do encontrado. Na norma Brasileira o valor máximo permitido para o tolueno é de  $170 \mu\text{g.L}^{-1}$  e para o Canadá quando o valor atinge  $100 \mu\text{g.L}^{-1}$  já indica uma contaminação severa. O valor de referência conforme CCMTR (1999), para consumo, é de  $2,0 \mu\text{g.L}^{-1}$ .

Este estudo demonstrou que os valores de benzeno e tolueno pelo CONAMA 357/05 estão adequados para os hidrocarbonetos testados. Para o valor de descarte de efluentes em corpos receptores conforme CONAMA 430/11 é recomendado à avaliação dos valores máximos permitidos a fim de garantir a proteção aquática. Para o consumo de água, o adequado seria acompanhar o mesmo valor do CONAMA 357/05 classe de água doce 2.

#### 5.4.6.2. Comparativo com CEO e CENO

Utilizando ferramentas estatísticas de regressão linear (Programa STATISTICA 6.0 – Statsoft ) - foi possível delinear a faixa de efeito observado nos organismos de *Daphnia magna*.

Para os hidrocarbonetos BTEX o CEO (10%) calculado está próximo a  $987 \mu\text{g.L}^{-1}$  ( $R^2 = 0,9467$ ) e o CENO é de  $900 \mu\text{g.L}^{-1}$ .

Para benzeno o CEO (10%) de  $50 \mu\text{g.L}^{-1}$  e CENO de  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ , enquanto que para o tolueno CEO (10%) de  $60 \mu\text{g.L}^{-1}$  e CENO de  $50 \mu\text{g.L}^{-1}$ .

O valor do CENO é o valor em que não foi observado efeito tóxico sobre os organismos testados, e comparando com os valores tabelados de BTEX com as normas do Quadro 25 as legislações que promovem a melhor proteção ambiental é a Lista Holandesa (valores de tolerância), o decreto 1190/04 para áreas de proteção ambiental, áreas agrícolas e residenciais; os valores do CONAMA 396/08 e Portaria N.2914/11 para o uso para consumo humano e os valores das classes de água 1 e 2 do CONAMA 357/05.

O valor de CEO na qual foi observado efeito significativo em 10% dos organismos testados verifica que valores de BTEX do CONAMA 430/11, CETSB/05, Decreto 1190/04 para atividade industrial, Lista Holandesa para Intervenção e CONAMA 420/09 estão acima do valor encontrado.

Para o benzeno verificando o valor de CENO de  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$  e CEO de  $50 \mu\text{g.L}^{-1}$  as normas do CONAMA 357/05, Portaria N. 2914/11 e CONAMA 396/08 para consumo de água, CONAMA 420/09 são de  $5 \mu\text{g.L}^{-1}$  o que corresponde a metade do valor do CENO e cinco vezes menor do CEO encontrado, promovendo a proteção ao consumo e ao meio ambiente. O CONAMA 430/11 estipula valor de  $1.200 \mu\text{g.L}^{-1}$  sendo 120 vezes maior que o CENO e 24 vezes maior que o CEO encontrado. Para atingir, por exemplo, o valor de referência do CONAMA 357/05 das classes de água doce 2 e 3, o corpo receptor deverá ter a capacidade de diluição de 240 vezes.

Para o tolueno verificando o valor de CENO de  $50 \mu\text{g.L}^{-1}$  e CEO de  $60 \mu\text{g.L}^{-1}$  apenas o CONAMA 357/05 se encontra abaixo do CEO e do CENO e o valor do CONAMA 396/08 para uso preponderante de dessedentação de animais. As demais referências todas se encontram acima dos valores encontrados. O CONAMA 430/11 estipula valor máximo de tolueno de  $1.200 \mu\text{g.L}^{-1}$  sendo 24 vezes maior que o CENO e 20 vezes maior que o CEO. Para atingir o valor de referência do CONAMA 357/05 das classes de água doce 2 e 3, o corpo receptor deverá ter a capacidade de diluição de 600 vezes.

Com essas bases de cálculo devemos extrapolar o que ocorre em lançamentos de efluentes em corpos receptores e observar a real necessidade de integrar a ecotoxicologia aliada nas questões ambientais para prevenir impactos ambientais nos níveis tróficos da cadeia alimentar aquática.

#### 5.4.7 Estudo Exploratório de benzeno em Espécimes de *Daphnia*

Os testes foram realizados para verificar a hipótese de incorporação do benzeno pelos espécimes de *Daphnia*. Os resultados estão na Tabela 17.

Tabela 17 - Resultados do teste de acumulação de benzeno com *Daphnia magna*

Espécimes de <i>Daphnias</i>	Concentração inicial ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	Concentração Após 48h ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	Redução por volatilização (%)	Redução total (%)
20	Zero	< 1,0	-	-
Zero	500,0 $\pm$ 4,0	476,5 $\pm$ 3,5	4,7 $\pm$ 0,3	-
20	500,0 $\pm$ 4,0	395,0 $\pm$ 2,9	-	21 $\pm$ 0,8

A redução da concentração de benzeno em 21% pode ser atribuída aos fenômenos de incorporação e de volatilização da substância. Estima-se que 16,3% da concentração inicial podem ter incorporado nos espécimes testados.

Foram realizadas observações visuais do comportamento dos espécimes de *Daphnia* durante o acréscimo de benzeno e realizadas observações microscópicas em objetivas de 40X. Após exposição foram visualizados pequenos inchaços internos na carapaça, conforme a figura 26.

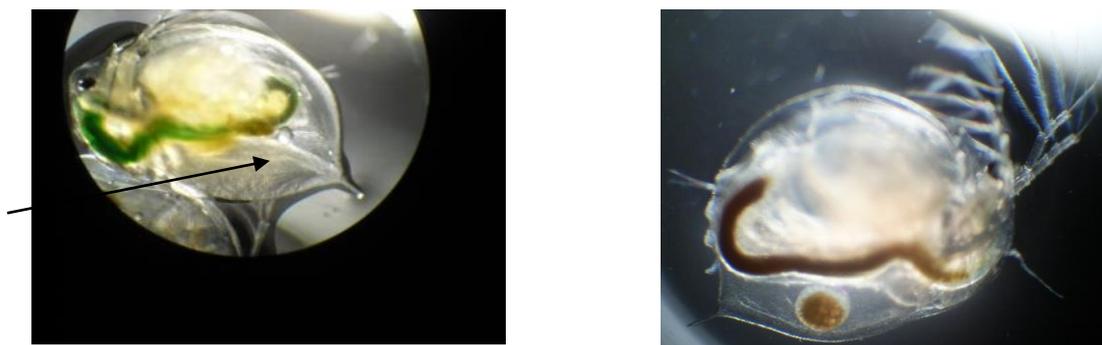
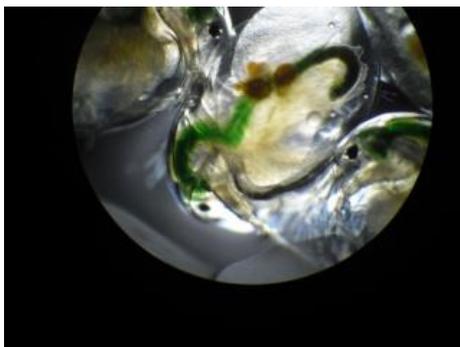


Figura 26 – À esquerda: foto do microcrustáceo *Daphnia magna* após exposição ao benzeno, microscópio aumento 40x; à direita: foto de um espécime de *Daphnia magna* em período fértil sem a exposição de benzeno, microscópio aumento 40x.

Também foi observado que instantaneamente todos os espécimes de *Daphnia* ficaram flutuando sobre a superfície da coluna de água. A densidade dos monoaromáticos é de aproximadamente 0,8 (quadro 1). Portanto, com a acumulação dos contaminantes na carapaça houve consequente alteração na densidade dos organismos e, por isso, a tendência foi à flutuação.

Ocorreu também a união das carapaças como se o benzeno provocasse uma força de atração molecular e os ovos também foram deslocados (Figura 27).



**Figura 27 - Foto de Vários espécimes de *Daphnia* após acréscimo de benzeno na água de cultivo, microscópio aumento 40X**

Os mecanismos de toxicidade aguda BTEX para os organismos aquáticos são pensados para incluir narcose inespecíficas e alterações da permeabilidade das membranas celulares, particularmente em as guelras (Meyerhoff, 1975, Morrow; Gritz; Kirton, 1975), ambas as respostas podem ser atribuídas à absorção de BTEX em membranas de lípidos ricos em células, causando inchaço da membrana e eventualmente ruptura ou defeitos (Abernethy *et al.*, 1986).

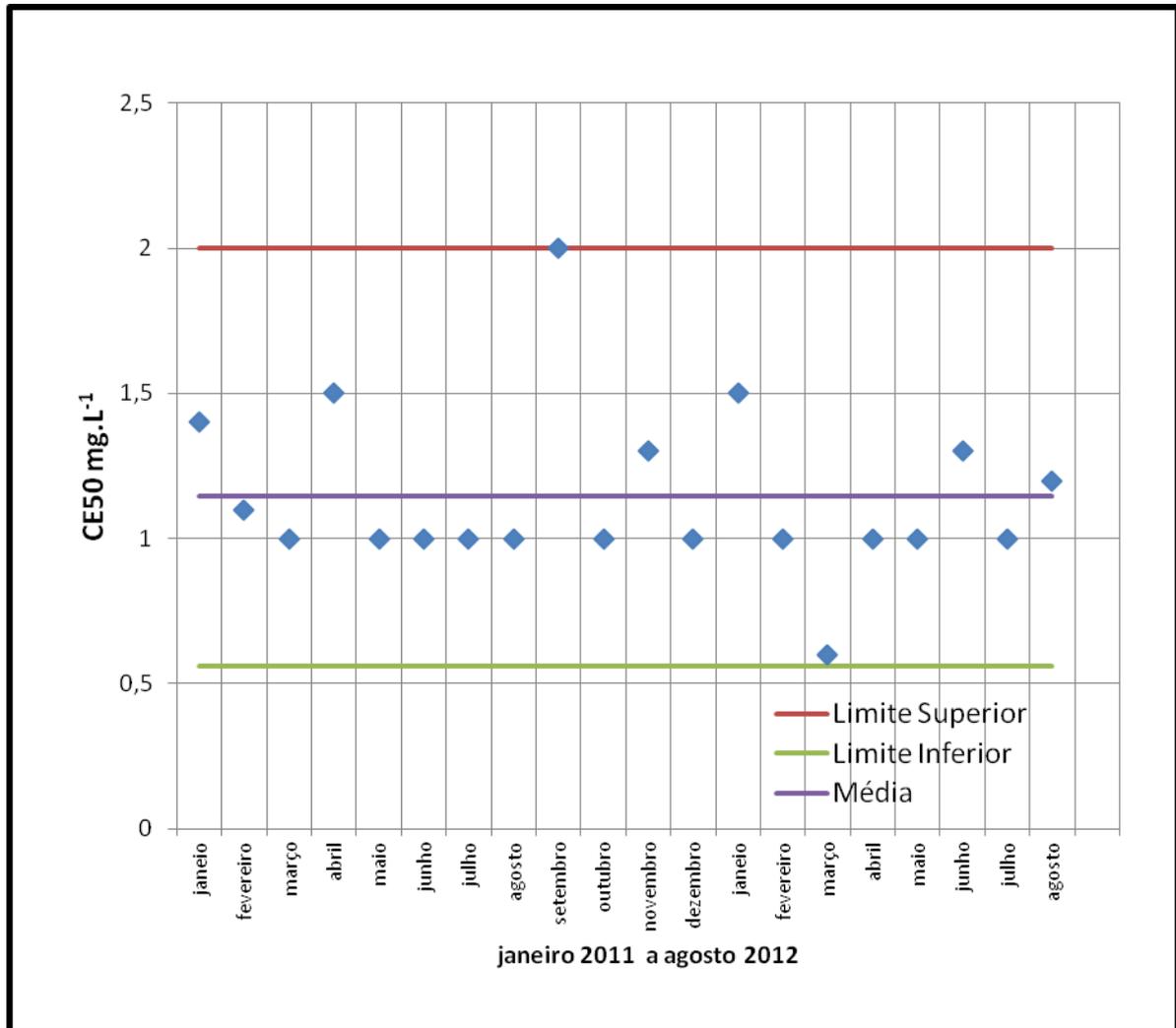
Conforme Choi *et al.* (1999) e Gibson (1984) os hidrocarbonetos podem se fixar em toda a superfície de organismos vivos. Almeida (1974) destacou a questão da acumulação de pesticidas em organismos, enquanto que Rand e Petrocelli (1985) e Space e Hamelink (1985) relatam que químicos penetram pelas mucosas, pele e guelras. Alexander (1999) afirma que alguns compostos se acumulam nos tecidos vegetais ou nas células.

De acordo com Cajaraville *et al.* (2000) a atividade de enzimas nos organismos fazem que compostos xenobióticos lipofílicos possam ser convertidos em compostos mais hidrofílicos aumentando a sua solubilidade em água e conseqüentemente sua entrada e saída das células. Esses compostos facilmente ficam bioacumulados nos tecidos ricos em lípidos de organismos marinhos. A maioria dos compostos orgânicos apolares não possui um modo específico de toxicidade, induzindo respostas tóxicas, quando eles se acumulam nos lípidos dos tecidos (em particular de membrana), causando narcose inespecífica (NEFF, 2002).

Com as observação realizadas é possível avaliar alguns dos efeitos de lançamento de monoaromáticos em coluna d'água de rios, sobre os organismos aquáticos. A preocupação não dever ser somente com grandes acidentes como derramamentos de óleo sobre o ecossistema aquático, mas sobre toda contribuição inclusive da fração do benzeno que não evapora rapidamente e tende a ocasionar aderência e acumulação nos organismos.

## 5.5 ENSAIOS EMPREGANDO *Vibrio fischeri*

### 5.5.1 Carta de Sensibilidade da Bactéria *Vibrio fischeri*



**Figura 28 – Carta de sensibilidade de *Vibrio fischeri* empregando sulfato de zinco.**

Pelos dados obtidos (Figura 28) pode ser observado que não ocorreram dados tendenciosos (sete dados consecutivos de um lado da linha central) e que os valores estão entre os limites aceitáveis (dois desvios padrões).

Tanto para a construção da carta controle como para todos os outros testes as culturas de bactérias foram avaliadas quanto a sua capacidade de emitir luz. Em todos os ensaios o fator de correção ficou compreendido entre 0,6 e 1,8, valores aceitáveis pelo método (ABNT, 2006).

Com a carta de sensibilidade e os requisitos de luminosidade emitida pela bactéria os resultados dos testes são considerados aceitáveis.

### 5.5.2 Volatilização de Monoaromáticos nas Condições Teste com *V. fischeri*

Para testar a volatilização de soluções aquosas de BTEX-mix, benzeno e tolueno em metanol foram realizados ensaios simulando teste de toxicidade com *Vibrio fischeri* (Tabelas 18 e 19).

**Tabela 18 - Valores obtidos no teste de volatilização de soluções de BTEX-mix nas condições teste de *Vibrio fischeri* (30 minutos).**

Parâmetro	Substância avaliada	Concentração Inicial ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	Concentração Final ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	Redução (%)
Branco	BTEX	< 1	< 1	-
BTEX-Mix	Benzeno	250 $\pm$ 1,9	166,7 $\pm$ 1,2	33,3 $\pm$ 2,5
	Tolueno	250 $\pm$ 2,3	152,6 $\pm$ 1,4	39,00 $\pm$ 3,6
	Etilbenzeno	250 $\pm$ 2,4	25,8 $\pm$ 0,2	89,7 $\pm$ 8,7
	<i>m,p</i> xilenos	250 $\pm$ 2,2	185,8 $\pm$ 1,7	25,7 $\pm$ 2,3
	<i>o</i> xileno	250 $\pm$ 16,3	182,4 $\pm$ 11,9	27,0 $\pm$ 3

As reduções de concentração representam perdas da concentração de componentes da amostra, e no caso do BTEX-Mix, significam também alterações do potencial tóxico da amostra. Importante ressaltar que nos estudos de volatilização ocorreu alteração das proporções dos componentes do BTEX-Mix, que no início apresentava concentração de 250 $\mu\text{g.L}^{-1}$  para cada componente e no final do teste essa proporção foi alterada para (0,67; 0,59; 0,04; 0,74; 0,73), o que pode alterar completamente o sinergismo da mistura.

**Tabela 19 – Valores obtidos com o teste de volatilização de solução aquosa de benzeno em metanol e de solução aquosa de tolueno em metanol nas condições dos testes com *Vibrio fischeri*.**

Amostras preparadas	Concentração Inicial ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	Concentração Final ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	Redução (%)
Benzeno	100,0 $\pm$ 7,4	58,0 $\pm$ 4,3	42,0 $\pm$ 3,1
Tolueno	100,0 $\pm$ 9,2	78,9 $\pm$ 7,3	21,1 $\pm$ 1,5

A grande proporção de volatilização dos hidrocarbonetos monoaromáticos nesse tipo de teste pode ocorrer principalmente devido ao processo de homogeneização inicial da amostra realizado por trapeamento utilizando a micropipeta e pela exposição do teste ser em tubo aberto.

Por esses resultados as perdas de voláteis são significativas, o que dificulta uma real avaliação do potencial tóxico dessas substâncias para a bactéria *Vibrio fischeri*. Outro inconveniente do teste com *Vibrio fischeri* é a necessidade de salinização da amostra antes dos testes. Essas alterações das condições iniciais das amostras afetam qualidade do ensaio, pois ocorre a alteração em todo equilíbrio osmótico do analito.

O acréscimo de cloreto de sódio nas amostras de compostos voláteis foi apenas investigado no teste de interferência de matriz, mais pelas propriedades coligativas a vaporização diminui com o acréscimo de substâncias não voláteis (efeito tonoscópico) e soluções mais concentradas possui menor pressão de vapor maior ponto de ebulição (efeito ebulioscópico).

O cloreto de sódio é hidrofílico e quando se dissolve forma os íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  que provocam uma interação química entre as moléculas que se atraem ou se repelem entre si, ocorrendo a quebra ou formação de ligações químicas. O cloreto de sódio altera a condutividade elétrica que envolve a passagem, através de um meio, de partículas carregadas eletricamente.

A volatilização do benzeno foi superior a de tolueno para soluções isoladas e o etilbenzeno quando se encontra em mix foi o mais volátil.

### 5.5.3 Ensaio de Toxicidade Aguda de Soluções Aquosas do BTEX-Mix em Metanol

Foram realizados um conjunto de ensaios com concentração de entre 10 a 1000  $\mu\text{g.L}^{-1}$  como teste preliminar (Tabela 20).

**Tabela 20 - Dados obtidos com teste preliminar de toxicidade de *V. fischeri* frente à BTEX.**

BTEX ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	Inibição luminescência (%)	Desvio padrão
0	0	0
10	0	0
25	0,75	0,35
50	3,01	0,28
75	5,58	1,13
100	6,19	0,49
500	61,49	0,28
1000	89,71	0,14

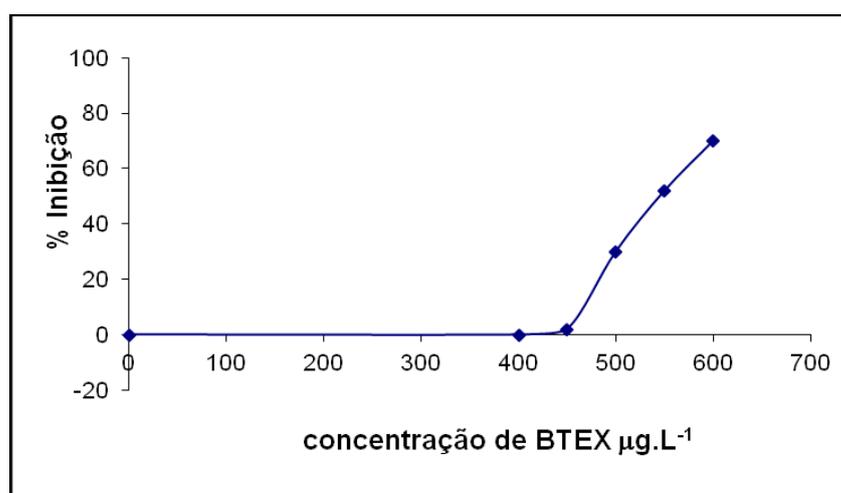
Pelos testes realizados somente acima de 500  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de BTEX ocorreu inibição significativa (superior a 20%) e em 1000  $\mu\text{g.L}^{-1}$  ocorreu inibição média de 89,7%. Empregando o método TSK foi calculado a CE50, com limite de confiança de 95% foi CE50 = 344,25  $\mu\text{g.L}^{-1}$  e limite inferior = 296,42  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ; e valor do limite superior = 399,80  $\mu\text{g.L}^{-1}$ .

Foi realizado um novo conjunto de testes de toxicidade de com *Vibrio fischeri* com os valores próximos de 500  $\mu\text{g.L}^{-1}$  região na qual no teste preliminar inibiu 61,49  $\pm$  0,28%. Os dados do novo teste estão descritos na Tabela 21, Figura 30.

**Tabela 21 - Dados obtidos com teste definitivo de toxicidade de *V. fischeri* frente à BTEX.**

BTEX ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	Inibição luminescência (%)	Devio Padrão
0	0	0
400	0,84	1,06
450	1,70	0,42
500	29,63	0,07
550	51,94	3,81
600	70,04	0,78

De acordo com os dados obtidos no segundo teste e comparando com o teste preliminar na região de 500  $\mu\text{g.L}^{-1}$  o primeiro ensaio ocorreu inibição de luminescência 61,49 $\pm$ 0,28% e no segundo ensaio a inibição foi de 29,63 $\pm$ 0,07%. Esse conjunto de testes não apresentou reprodutibilidade para os primeiros valores de inibição, no entanto, para CE50 (calculado no TSK ) os valores encontrados foram semelhantes.



**Figura 29 - Curva de concentração - resposta do teste definitivo de toxicidade de *V. fischeri* frente à BTEX.**

Empregando o método TSK foi calculado a CE50, com limite de confiança de 95% sendo CE50 = 546,36  $\mu\text{g.L}^{-1}$  com o limite inferior = 531,73  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ; e valor do limite superior = 561,40  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . A tabela 22 compara os dois resultados a do primeiro e do segundo teste.

**Tabela 22- Valores de CE50 de BTEX dos testes 1 e 2 com V. Fisher.**

	Primeiro Ensaio ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	Segundo Ensaio ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )
CE50	344,25	546,36
Limite de confiança inferior	296,42	531,73
Limite de confiança superior	399,80	561,40

Pelos resultados é possível observar que não houve reprodutibilidade nos ensaios. Uma das formas de explicar a falta de reprodutibilidade dos ensaios está relacionada com a volatilização das amostras.

De acordo com Headley et al. (2000) níveis de BTEX abaixo de 5  $\text{mg.L}^{-1}$  não induzem toxicidade para *Vibrio fischeri* mas nesse estudo não foram observados as questões de volatilidade. Testes para confirmação foram realizados e demonstraram que apenas em valores de 15 e 25  $\text{mg.L}^{-1}$  ocorreu efeito tóxico e em concentrações de 500  $\mu\text{g.L}^{-1}$  ocorreu efeito significativo.

De acordo com o Neff (2002) a solubilidade na água do mar é menor do que a em água doce por causa de *salting out* (solubilidade de compostos orgânicos apolares diminui como o aumento das concentrações de sais inorgânicos) e o teste com *Vibrio fischeri* é realizado em matriz contendo sais dissolvidos devido à salinização das amostras, causando alterações na qualidade do teste.

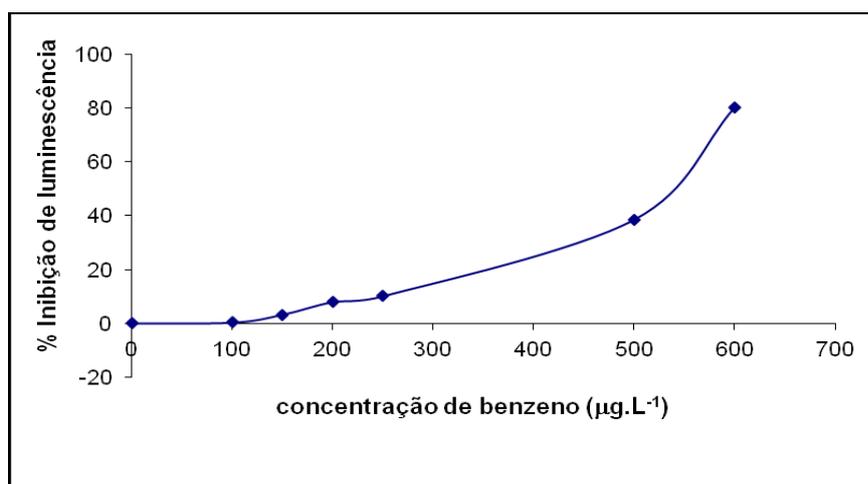
Pelos testes realizados, principalmente devido às altas taxas de volatilização, não foram realizadas comparações dos resultados de CE50 obtidos com os valores máximos permitidos das legislações.

#### 5.5.4 Ensaios de Toxicidade Aguda de Soluções Aquosas do Benzeno em Metanol

Os resultados do teste preliminar realizado com um conjunto de ensaios com concentrações de 20, 100, 150, 200, 250, 500 e 600  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , estão apresentados na Tabela 23, Figura 31).

**Tabela 23– Teste preliminar empregando *Vibrio fischeri* para determinar curva concentração – resposta do benzeno.**

Benzeno ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	Inibição luminescência (%)	Desvio padrão (%)
0	0	0
20	0	0
100	0,33	0,42
150	3,26	0,46
200	8,01	1,14
250	10,1	1,40
500	38,5	5,40
600	80,15	2,71



**Figura 30 - Curva concentração - resposta teste preliminar de toxicidade de *V. fischeri* frente ao benzeno.**

Com os valores da Tabela 23 e empregando o método TSK foi calculado a CE50, com limite de confiança de 95% sendo  $CE50 = 498,49 \mu\text{g.L}^{-1}$  e limite inferior =  $460,07 \mu\text{g.L}^{-1}$ ; e valor do limite superior =  $540,12 \mu\text{g.L}^{-1}$ .

Após definir a faixa de concentração a ser utilizada no teste definitivo, foram realizados três conjuntos de testes empregando as concentrações de 450, 500, 550, 600 e 650  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . A realização desses testes serviu como base para avaliação da reprodutibilidade dos ensaios em soluções de benzeno que, anteriormente, apresentaram volatilidade média de 40%.

Os resultados estão apresentados na Tabela 24 e Figura 32.

**Tabela 24 - Dados obtidos com três conjuntos de teste de toxicidade de *V. fischeri* frente a benzeno.**

Benzeno ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	Inibição de luminescência, desvio padrão (%)		
	Teste 1	Teste 2	Teste 3
450	39,30 $\pm$ 1,7	30,06 $\pm$ 1,90	28,37 $\pm$ 1,34
500	51,78 $\pm$ 2,19	37,92 $\pm$ 0,28	37,69 $\pm$ 0,21
550	62,50 $\pm$ 0,10	42,55 $\pm$ 3,25	39,77 $\pm$ 1,70
600	69,42 $\pm$ 0,56	80,26 $\pm$ 0,21	77,75 $\pm$ 0,56
650	93,42 $\pm$ 0,42	90,57 $\pm$ 0,07	89,51 $\pm$ 0,71
EC50 ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	493,25	543,48	544,99
Limite inferior (95%)	467,43	524,72	527,68
Limite superior (95%)	520,51	562,91	562,86



**Figura 31 – Representação dos valores obtidos para os testes com benzeno empregando bactéria *Vibrio fischeri*.**

Pela representação gráfica dos testes verificamos que ocorre tendência e o teste 1 foi o que apresentou menor reprodutibilidade em comparado com os testes 2 e 3, esse tipo de resultado é característico na realização de ensaio utilizando *Vibrio fischeri* demonstrando que o bioensaio têm algumas dificuldades na reprodução, precisão e exatidão analítica.

#### 5.5.5 Ensaios de Toxicidade Aguda de Soluções Aquosas do Tolueno em Metanol

Os resultados dos ensaios de toxicidade *Vibrio fischeri* frente ao Tolueno nas concentrações de 10 a 200  $\mu\text{g.L}^{-1}$  estão apresentados na Tabela 25.

**Tabela 25** - Dados obtidos do ensaio preliminar de tolueno com *Vibrio fischeri*

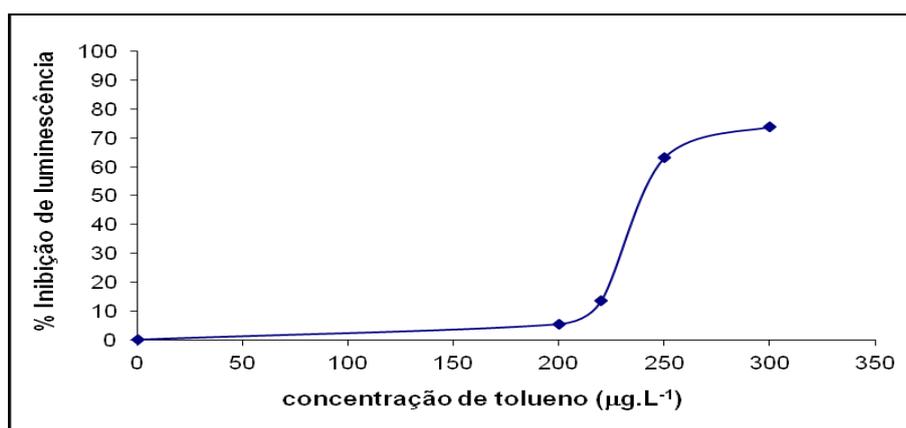
Tolueno ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	Inibição luminescência (%)	Desvio padrão (%)
0	0	0
10	0	0
50	1,92	0,90
100	5,25	0,95
150	5,63	1,30
170	7,23	0,11
200	8,74	0,09

Pelos resultados obtidos no teste preliminar não ocorreu CE50 em nenhuma das soluções testadas. Foi realizado novos testes com tolueno em concentrações entre 200 a 300  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (Tabela 26, Figura 33).

**Tabela 26** - Dados obtidos no segundo ensaio de tolueno com *Vibrio fischeri*

Tolueno ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	Inibição luminescência (%)	Desvio padrão (%)
0	0	0
200	5,41	0,56
220	13,51	0,28
250	63,15	0,07
300	73,97	0,71

Com os valores da Tabela 26 e empregando o método TSK foi calculado a CE50, com limite de confiança de 95% obtendo-se  $\text{CE50} = 246,14 \mu\text{g.L}^{-1}$  e limite inferior =  $237,32 \mu\text{g.L}^{-1}$ ; e valor do limite superior =  $255,28 \mu\text{g.L}^{-1}$

**Figura 32** - Curva concentração - resposta de toxicidade de *V. fischeri* frente ao tolueno

Pela curva de concentração – resposta apresentado podemos acompanhar a resposta exponencial do organismo sobre o aumento da concentração do agente tóxico.

Vieira (2004) relata o estudo da toxicidade aguda do tolueno sobre um microcrustáceo marinho *Metamysidopsis elongata atlântica*, nesse estudo o resultado da CL50 (48h) para tolueno foi 235,7  $\mu\text{g.L}^{-1}$ .

Mesmo tendo sido obtidos resultados que demonstram a sensibilidade do organismo teste, a volatilização de 21% dificulta a realização e recomendação do bioensaio com *Vibrio fischeri*, nas condições da metodologia empregada.

## 5.6 ENSAIOS DE TOXICIDADE CRÔNICA EMPREGANDO *Desmodesmus subspicatus*

### 5.6.1 Carta de Sensibilidade.

A Figura 33 mostra a carta de sensibilidade confeccionada a partir dos resultados de 20 meses de acompanhamento da cepa de algas em laboratório.

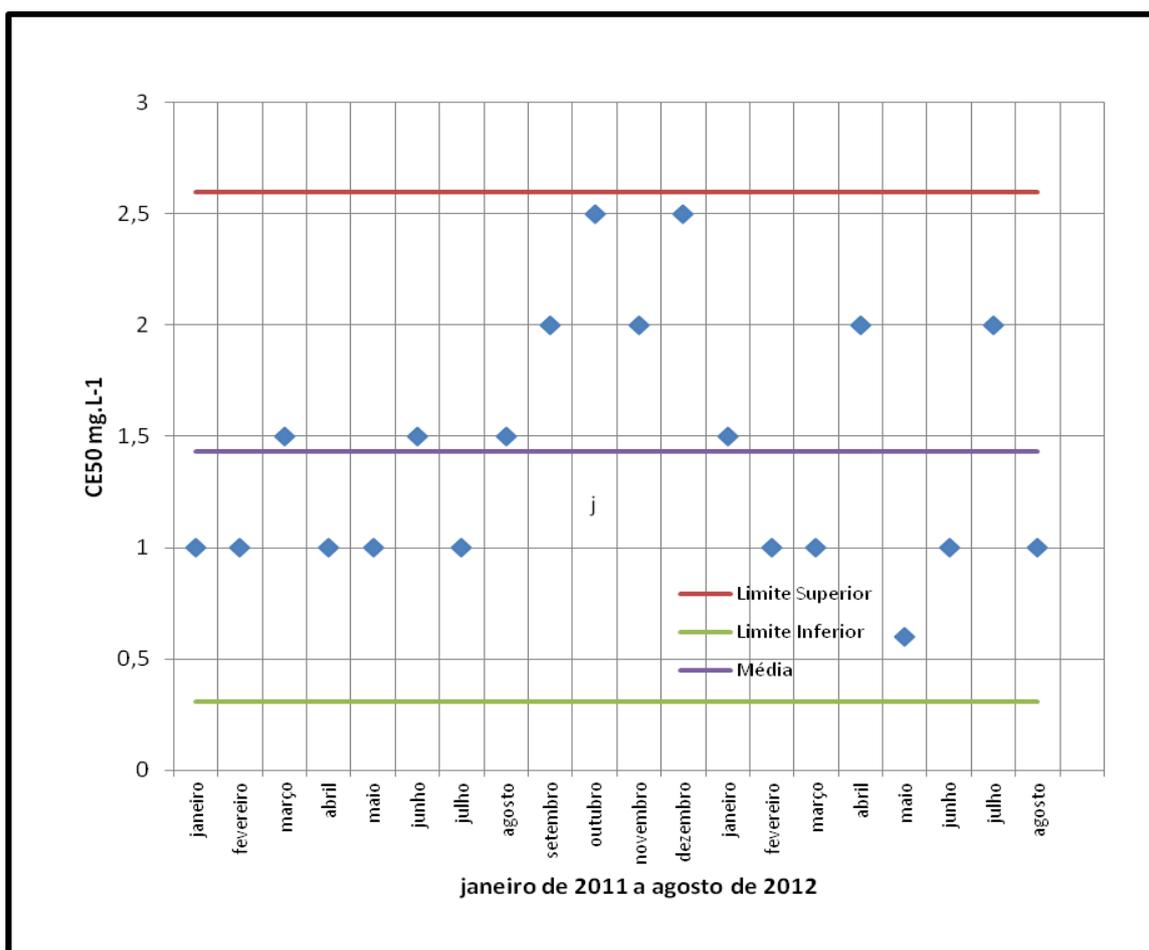


Figura 33 – Carta de sensibilidade para a alga *Desmodesmus subspicatus* utilizando sulfato de cobre como substância de referência.

Plotando os dados obtidos nos testes mensais foi possível verificar que os valores atendem a uma distribuição de acordo com a Norma ABNT 12648/2011 (ABNT, 2011) e estão entre os limites máximos ( $\pm 2$  desvios padrão). Com esses resultados é possível considerar que a cultura de algas utilizada atendia as condições para ser empregada nos estudos de toxicidade crônica.

#### 5.6.2 Volatilização de Soluções Aquosas de Benzeno e Tolueno em Metanol nas Condições Teste com *D. subspicatus*

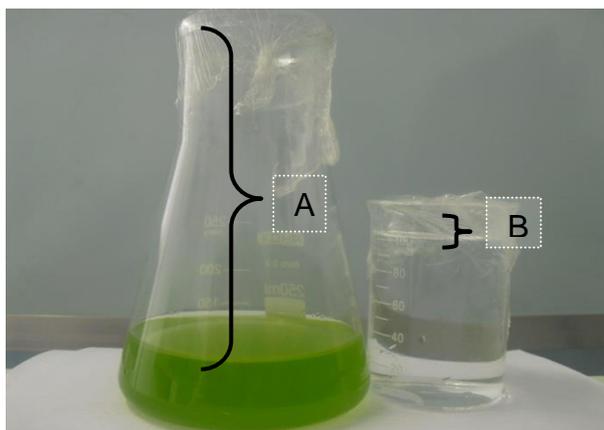
Concomitante ao bioensaio, foram realizados testes com benzeno e tolueno para verificação das volatilizações. Para o benzeno a concentração estudada de  $100 \pm 7,4 \mu\text{g.L}^{-1}$  sem a adição da alga, restaram  $89 \pm 6,5 \mu\text{g.L}^{-1}$  no final do período de exposição, representando uma redução de  $11 \pm 0,81\%$ . Para os estudo da volatilização com tolueno foram avaliadas 4 concentrações e os resultados estão apresentados na Tabela 27.

**Tabela 27 – Valores do teste de verificação da volatilidade do tolueno nas condições similares ao teste com *Desmodesmus subspicatus*.**

Concentração Inicial ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	Convenção final ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	Redução (%)
150,0 $\pm$ 1,4	138,4 $\pm$ 1,0	7,8 $\pm$ 0,1
250,0 $\pm$ 2,3	208,0 $\pm$ 1,9	16,8 $\pm$ 0,2
500,0 $\pm$ 4,6	408,5 $\pm$ 3,7	18,3 $\pm$ 0,2
5000,0 $\pm$ 46,0	3.858,3 $\pm$ 39,4	23,0 $\pm$ 0,2

Embora o testes de alga sejam conduzidos em recipientes cobertos, ocorreram perdas de benzeno e de tolueno superiores as obtidas nos ensaios de volatilização para os testes com *D. magna*.

O teste com alga, além de ser conduzido por um período maior (96h), o uso de erlenmeyers sob agitação constante, permitem também grande espaço para que ocorra o equilíbrio químico entre as fases (líquida e ar), ocorrendo portanto a volatilização, conforme ilustrado na Figura 35.



**Figura 34 – Erlenmeyer e Becker utilizados para os testes com *Desmodesmus subspicatus* (esquerda) e *Daphnia magna* (direita). Em A e B estão indicados espaços sem amostra onde pode ocorrer “headspace”.**

De acordo com Gschwend e MacFarlane, (1986) a evaporação é quantitativamente a mais importante via de perdas de BTEX e em condições naturais e o tempo de residência do BTEX na água é de dias e em condições turbulentas as perdas são mais rápidas, reduzindo significativamente esse tempo.

O ensaio através de agitação em mesa orbital pode ter contribuído para o aumento de volatilização. O que podemos notar em concentrações maiores é diretamente proporcional ao aumento de volatilização do componente em estudo.

Com esses dados, o valor de volatilização impede a realização de comparação entre os valores máximos permitidos das legislações.

### 5.6.3 Ensaio de Toxicidade Crônica de Soluções Aquosas do BTEX-Mix em Metanol

Os resultados obtidos dos testes realizados com BTEX-mix mostraram que não ocorreu inibição de crescimento das algas até a concentração de  $1000 \mu\text{g.L}^{-1}$ . Com esses resultados a alga *Desmodesmus subspicatus* não apresentou sensibilidade nas concentrações de mix BTEX estudadas.

O teste com BTEX foi repetido empregando uma nova cepa de alga obtido em um centro de pesquisas (Cepa 2) e também não apresentou sensibilidade em até  $1000 \mu\text{g.L}^{-1}$ , confirmando que as concentrações estudadas não causam efeito significativo nesse organismo teste. Os resultados dos ensaios com as duas cepas (cepa 1 – TECLAB, cepa 2 – laboratório B) podem ser visualizadas no apêndice C.

Herman *et al.* (1990) realizaram estudo de toxicidade com as substâncias xilenos (*m*, *o*, *p*) empregando *Selenastrum capricornutum* e não observaram qualquer efeito sobre a alga, as concentrações avaliadas de *m*-xileno, *o*-xileno e *p*-xileno em 0,9 mg.L<sup>-1</sup>, 0,7 mg.L<sup>-1</sup> e 1 mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente.

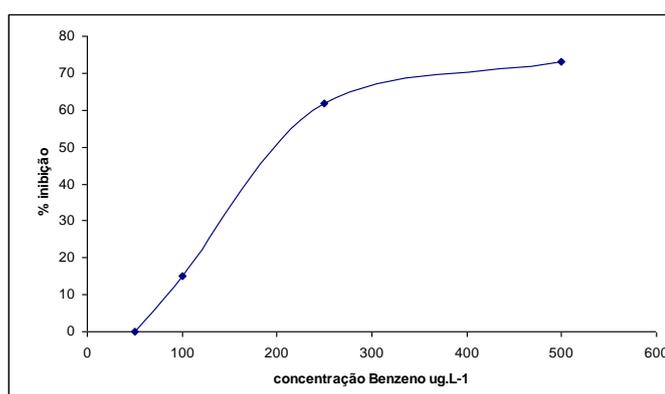
#### 5.6.4 Ensaios de Toxicidade Crônica de Soluções Aquosas do Benzeno em Metanol

Na Tabela 28 estão apresentados os resultados obtidos nos testes de benzeno.

**Tabela 28 – Valores dos testes realizados com as soluções de benzeno**

Testes Concentração (µg.L <sup>-1</sup> )	Média e desvio padrão clorofila final (µg.L <sup>-1</sup> )	% inibição (média)
Branco	7,20 ± 0,22	Controle
10	7,73 ± 0,26	0
50	7,90 ± 0,06	0
100	6,11 ± 0,1	15,14
250	2,74 ± 0,46	61,90
500	2,01 ± 0,03	73,20
1000	1,15 ± 0,08	84,03

Plotando os dados através do programa CIP (US EPA 2002) para o cálculo da concentração de inibição 50% - CI (50%) foi encontrado o valor de: 197,90 ± 7,1 µg.L<sup>-1</sup>. Pelo gráfico de concentração – resposta (Figura 36) pode ser observada a tendência da inibição conforme o aumento da concentração do benzeno.



**Figura 35- Representação gráfica concentração - resposta do benzeno em teste com *Desmodesmus subspicatus*.**

Na Figura 36 pode ser observado que a característica da curva é semelhante a curva apresentada pela literatura (Figura 6) para toxicidade crônica.

Não foram localizados estudos ecotoxicológicos avaliando toxicidade de hidrocarbonetos monoaromáticos frente a algas *Desmodesmus subspicatus* (*Scenedesmus subspicatus*, nome anterior).

Os resultados citados para as algas *Pseudokirchneriella subcapitata* tanto por Herman *et al.* (1990) e quanto por Mayer *et al.* (2001) relatam que a toxicidade encontrada, para benzeno, em CL50 foi de 41 mg.L<sup>-1</sup> e de 8,3 mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente. Em nenhum dos trabalhos era citado à solubilização do benzeno ou outro método que facilitasse o preparo da amostra.

#### 5.6.5 Ensaios de Toxicidade Crônica de Soluções Aquosas do Tolueno em Metanol

Os ensaios com tolueno foram realizados com a cepa do Laboratório Teclab procedendo conforme ABNT. Na tabela 29 estão descritas os resultados obtidos nos testes do branco e os resultados com as soluções de tolueno.

**Tabela 29– Valores do teste 1 - bioensaio de tolueno com alga *D. subspicatus***

<b>Testes Concentração (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Média e desvio padrão clorofila final (µg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>% inibição (média)</b>
BRANCO	7,20 ± 0,22	Controle
0,1	9,84 ± 0,29	0
1	9,27 ± 0,16	0
5	6,32 ± 0,17	12,22
10	4,07 ± 0,04	43,47
20	1,68 ± 0,43	76,67
50	1,77 ± 0,39	75,42

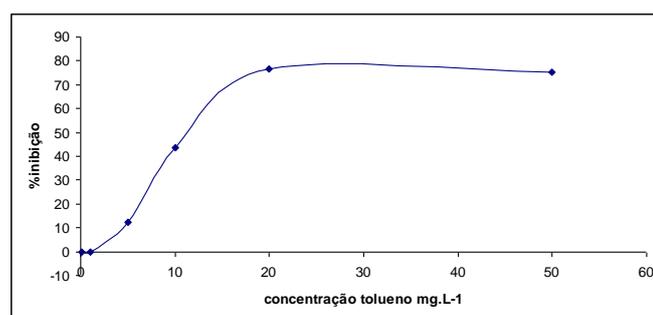
Plotando os dados através do programa US EPA 2002 para o cálculo da concentração de inibição CI (50%) encontramos o valor de: 8,12 ± 0,21 mg.L<sup>-1</sup>.

Visando delinear uma segunda curva concentração-resposta com valores mais próximos ao CE50 de 8 mg.L<sup>-1</sup>, um segundo teste foi realizado e os dados estão na tabela 30.

**Tabela 30 - Valores do teste 2 - bioensaio de tolueno com alga *D. subspicatus***

Testes Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )	Média e desvio padrão clorofila final (µg.L <sup>-1</sup> )	% inibição (média)
Branco	12,30 ± 4,1	Controle
2	11,20 ± 3,7	8,9
5	9,70 ± 3,2	21,1
6	7,41 ± 2,4	39,8
7	6,70 ± 2,2	45,5
8	5,12 ± 1,7	58,5
10	3,90 ± 1,3	68,3

Plotando os dados através do programa CIP (US EPA 2002) para o cálculo da concentração de inibição - CI(50%) encontramos o valor de: 7,27 ± 0,17 mg.L<sup>-1</sup>. Pelo gráfico de dose – resposta figura 36 podemos ver a tendência da inibição conforme o aumento da concentração do tolueno.



**Figura 36- Representação gráfica concentração- resposta do Tolueno**

Os valores obtidos dos testes realizados com algas estão descritos na tabela 31 para os três bioensaios realizados.

**Tabela 31 - Valores de CE50 obtidos dos testes de BTEX-mix, benzeno e tolueno dos testes realizados com *D. subspicatus*.**

Testes	BTEX (µg. L <sup>-1</sup> )	Benzeno (µg.L <sup>-1</sup> )	Tolueno (mg.L <sup>-1</sup> )
Teste 1 (cepa 1)	> 1000	197,90 ± 7,1	7,27 ± 0,17
Teste 2 (cepa 2)	> 1000	Não realizado	Não realizado

Da mesma forma que a *Daphnia magna* o benzeno isolado apresentou mais toxicidade em comparado com a mistura de BTEX. Desta forma, podemos inferir que para os compostos estudados, eles se apresentam mais tóxicos isolados em relação quando eles estão combinados em misturas.

Isso pode ocorrer devido ao antagonismo químico, gerando competição entre sítios de ação e por fim não ocorre ação tóxica.

Alguns estudos, por exemplo, *Pseudokirchneriella subcapitata* realizado por Halling-Srensen (2000) foram encontrados valores de CE50 de 1,38 mg.L<sup>-1</sup> para a substância Trimethoprim, Eguchi *et al.* (2004) encontrou CE50 de 80,3 mg.L<sup>-1</sup> para a mesma substância e Robinson *et al.* (2005) encontrou CE50 de 5 mg.L<sup>-1</sup> para a substância Flumequine. Isso demonstra que as algas respondem a diversas substâncias e a doses elevadas. Alguns cientistas buscam o potencial degradador de algas em diversos poluentes persistentes.

Comparando o dado obtido de benzeno e tolueno com Herman *et al.* (1990) com *Pseudokirchneriella subcapitata* o CE50 para benzeno e tolueno, 41 mg.L<sup>-1</sup> e 9,4 mg.L<sup>-1</sup> respectivamente, o tolueno teve resultados bem próximos ao encontrado nesse estudo. Para o benzeno, a alga *Desmodesmus subspicatus* é mais sensível em comparação com a *P. subcapitata*.

De acordo com valores citados nas fichas de segurança *Scenedesmus quadricauda* expostas a xilenos têm redução na multiplicação celular em concentrações 200 mg.L<sup>-1</sup> e, em 3 mg.L<sup>-1</sup>, por 8 horas causa uma redução de 50% na fotossíntese. O xileno não foi testado separadamente mais possui peso molecular bem próximo do tolueno que apresentou toxicidade em 7,27 mg.L<sup>-1</sup>.

Hidrocarbonetos aromáticos voláteis apresentaram um efeito sobre o crescimento da alga *Pseudokirchneriella subcapitata*, apresentando uma CE50 para benzeno e tolueno de 41 mg/L e 9,4 mg/L, respectivamente (Gamo *et al.*, 2003).

Para os monoaromáticos estudados a alga *Desmodesmus subspicatus* foi sensível apenas em altas concentrações, além de apresentar volatilizações significativas, não sendo indicada para biomonitoramento ambiental de teste crônico em efluentes descartados em corpo receptores, podendo ser substituído, por exemplo, teste com *Ceriodaphnia dubia*.

Quando a metodologia para testes com alga *Desmodesmus subspicatus* são necessários triplicata da amostra para reduzir desvios analíticos, sendo um teste longo e manutenções das algas no laboratório devem ser cautelosas para não ocorrer contaminações, leituras do teste final através de fluorimetria são rápidas fazendo que todas as soluções possam ser analisadas quase no mesmo momento, o que não acontece em contagem via microscópio.

## 6 CONCLUSÕES

O estudo em questão foi importante para delinear as dificuldades quando se trabalha com compostos voláteis e a grande importância de integrar valores físicos e químicos com a ecotoxicologia. Alguns autores como, por exemplo, Vieira (2004), já manifestam sobre dificuldade de obter dados sobre a toxicidade com compostos monoaromáticos, por isso a grande importância do trabalho desenvolvido.

Foi possível, contudo, comparar os valores normativos com os valores de CE50 e CE10 obtidos para fomentar o estudo da ecotoxicologia a serviço das legislações ambientais e podemos perceber que muitas normas precisam evoluir na mesma proporção que ecotoxicologia cresce nas questões de proteção ambiental. Para emissão de efluentes em corpo receptor os valores máximos permitidos devem ser avaliados sempre zelando por toda a ecologia do rio. Para consumo de água os valores máximos permitidos devem priorizar a saúde e bem estar daqueles que a consomem.

Os valores de referência no Brasil para estudo de passivo devem ser divididos em valores de alerta e valores de intervenção integrando também o estudo da ecotoxicidade em diversos níveis tróficos da cadeia alimentar para compor o relatório final de áreas degradadas.

Para esse estudo a *Daphnia magna* foi considerada um ótimo organismo teste devido a facilidade de execução dos testes e aos resultados obtidos.

Para o teste com *Vibrio fischeri* e com *Desmodesmus subspicatus* os monoaromáticos estudados comprometeram a reprodutibilidade. O teste com *V. fischeri* embora seja um teste extremamente rápido o emprego de cubetas reacionais em sistema aberto apresentaram grandes perdas por volatilização enquanto que para os ensaios empregando *D. subspicatus* o tempo prolongado e a necessidade de agitação também foram os responsáveis pela volatilidade dos testes e a redução de reprodutibilidade.

Pelo desenvolvimento desse estudo foi possível concluir que dentre os ensaios realizados o bioindicador indicado para os compostos estudados é o microcrustáceo *Daphnia magna*.

## 7 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Em função do trabalho realizado são apresentadas as recomendações para realizações de estudo de toxicidade empregando hidrocarbonetos monoaromáticos.

- Para testes com *Vibrio fischeri* avaliar os tempos de exposição de 5, 10 e 15 minutos e recobrir os tubos de ensaio para minimizar perdas;
- Avaliar a toxicidade de monoaromáticos empregando microcrustáceo *Ceriodaphnia dubia*;
- Avaliar outros solventes para solubilizar os compostos monoaromáticos, a fim de comparar e padronizar o mais aplicável;
- Estudar a toxicidade dos compostos etilbenzeno e xilenos para ampliar o conhecimento e discussão sobre o sinergismo dos compostos BTEX em misturas.
- Realização de testes de genotoxicidade para os compostos estudados.

## REFERÊNCIAS

ABERNATHY, S. A. M. BOBRA, W.Y. SHIU, P.G. WELLS, AND D. MACKAY.. 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.

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12.648**: Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica – Método de ensaio com algas (Chlorophyceae), 2011.

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

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 15411**: Ecotoxicologia aquática - Determinação do efeito inibitório de amostras de água sobre a emissão de luz de *Vibrio fischeri* (ensaio de bactéria luminescente), 2006.

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 17.025**: Requisitos para competência de laboratórios, 2005.

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 16.725**: Resíduo químico – Informações sobre segurança, saúde e meio ambiente, 2011.

ACGIH, American Conference of Governmental Industrial Hygienists. **Documentation of Threshold Limit Values (TLV) for Chemical Substances and Physical Agents and Biological Exposure Indexes (BEI)** Cincinnati, OH: ACGIH, 2001.

ACGIH, American Conference of Governmental Industrial Hygienists. **TLVs e BELs: limites de exposição (TLVs) para substâncias químicas e agentes físicos e índices biológicos de exposição (BELs)**. Tradução da Associação Brasileira de Higienistas Ocupacionais. Campinas, 2003.

ACGIH. **Threshold limit values for chemical substances and physical agents and biological exposure indices**. American Conference of Governmental Industrial Hygienists. Cincinnati, OH; 2000.

AIVALIOTI, M.; POTHOUKAKI D.; PAPOULIAS, P.; GIDARAKOS, E. Removal of BTEX, MTBE and TAME from aqueous solutions by adsorption onto raw and thermally treated lignite, **Journal Hazardous Materials**, v. 207-208, p.136-146, 2011.

ALEXANDER, M. **Biodegradation and bioremediation**, 2º ed San Diego: Academic Press, 1999.

ALMEIDA, W.F. Acúmulo de Inseticidas no homem e sua significação epidemiológica – **O Biológico**, v. 40 (6), p.171-173, 1974.

AMARANTE JR., O. P. de. **Avaliação do potencial de contaminação por herbicidas – determinação do 2,4-D e do seu principal produto de degradação em solos de campos de cultivo de eucaliptos**. 2002,125f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Maranhão - UFMA, 2002.

ANDRADE, J. A.; AUGUSTO, F.; JARDIM, I. C. S. F. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. **Eclética Química** [online], v. 35, nº .3, p. 17-43, 2012.

APHA, AWWA, WEF in: L.S. Clesceri, A.E. Greenberg, A.D. Eaton (Eds.), **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, 22th ed., American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, Washington, DC, USA, 2012.

ARAGÃO, M. A.; ARAÚJO, R. P. A. Métodos de Ensaio de Toxicidade com Organismos Aquáticos. Cap. 6, p. 117 – 152. In: ZAGATO, P.A. e BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática – princípios e aplicações**. ZAGATTO e BERTOLETTI (org.) São Carlos: Rima, 2008.

ASTM, American Society for Testing and Materials. **Standard practice for algal growth potencial testing with *Selenastrum capricornutum***. Annual Book of ASTM Standards, 32p. D 3978-80. 1981.

ATDSR. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Department of Health and Human Services, Public Health Service. **Toxicological profile for xylenes**. ATDSR. Atlanta, 1995.

AZEVEDO, F. A. **Toxicologia do Mercúrio**. São Carlos: Rima, 292p., 2003.

BAILEY, H. C.; LIU, D.H.W.; JAVITZ, H.A. Time/Toxicity Relationships in Short-Term Static, Dynamic, and Plug-Flow Bioassays. In: R.C. Bahner and D.J. Hansen (Eds.). **Aquatic Toxicology and Hazard Assessment**, 8th Symposium, ASTM STP 891, Philadelphia, p. 193-212. 1985.

BAILEY, H.C.; KRASSOI, R.; ELPHICK, J.R.; MULHALL, ANN-MAREE; HUNT, P.; TEDMANSON, L; LOVELL, A. Whole effluent toxicity of sewage treatment plants in the Hawkesbury-Nepean Watershed, New South Wales, Australia, to *Ceriodaphnia dubia* and *Selenastrum capricornutum*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.19 (1), p. 72-81, 2000.

BAIRD, C. **Química Ambiental**. 2ª ed. Porto Alegre: Bookman, 622p., 2002.

BALLANTYNE, B. Exposure-dose-resposta relationships. In: SULLIVAN, J.B.; KRIEGER, G. R. Hazardous materials toxicology: **Clinical Principles of Environmental Health Baltimore**: Williams & Wilkins, p. 24-30. 1997.

BANDEIRANTE. **Ficha de informação do xileno N. 118**, revisão 00 - Bandeirante Química Ltda, [on line], acesso: 10 de julho de 2012, 2012.

BARATA, C.; ALARION, P.; GUTIERREZ-ALONSO, S. RIVA, M. C.; FERNANDEZ C.; TARAZONA, J. V. A *Daphnia magna* feeding bioassay as a cost effective and ecological relevant sublethal toxicity test for Environmental Risk Assessment of toxic effluents. **Science Total Environmental**, v.1, p. 78-86, 2008.

BARNES, E RUPERT R. D. **Zoologia dos Invertebrados**, 6º edição, São Paulo: Roca, 1996

BEIJERINCK, M. W. Le Photobacterium luminosum, bactérie lumineuse de la Mer du Nord. **Archives Neerlandaises des Sciences Exactes et Naturelles**, v. 23, p. 401-415, 1889.

BENDER, J.; S.; E, U. M.; PHILIPS, P. **Applied Environmental Microbiology**. v. 60, p.2311-239, 1994.

BENVILLE, P.E., Jr. and KORN, S. The acute toxicity of six monocyclic aromatic crude oil components to striped bass (*Morone saxatilis*) and bay shrimp (*Crago franciscorum*). **California Fish and Game**, v. 63(4), p.204-209, 1977.

BERTOLETTI, E. Toxicidade e concentração de agentes tóxicos em efluentes industriais na grande São Paulo. **Ciência e cultura** [online], v. 42 (3/4), p. 271-277, 1990.

BEZERRA, P. G. **Contaminação de águas subterrâneas por BTEX em Salvador, Bahia**, 2012, 88f. Dissertação (Mestrado em Geoquímica) - Programa de Pós-graduação em Geoquímica: Petróleo e Meio Ambiente - POSPETRO, Instituto de Geociências, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2012.

BILLINTON, N.; HASTWELL, P. W.; BEERENS, D. BIRRELL, L. ELLIS, P.; MASKELL, S.; WEBSTER, T.W.; WINDEBANK, .; WOESTENBORGH, F.; LYNCH, A. M. ; SCOTT, A. A. D.; TWEATS, D. J.; VAN GOMPEL, J.; REES, R. W.; WALMSLEY, R.M. Interlaboratory assessment of the GreenScreen HC GADD45a-GFP genotoxicity screening assay: an enabling study for independent validation as an alternative method **Mutation Research**, 653 p. 23–33, 2008

BLACK, J. A.; BIRGE, W.J.; McDONNELLI, W.E.; WESTERMAN, A.G.; RAMEY, B.A.; BRUSER, D.M. **The aquatic toxicity of organic compounds to embryol larval stages of fish and amphibians**. Research Report N°. 133. Water Resources Research Institute, University of Kentucky, 1982.

BLAISE, C. Introduction to ecotoxicological concepts. Proceedings of biological testing hazard assessment. **Environmental Canada**, v.4 , p. 11-47, 1984.

BRASIL. **Lei N°. 9605** de 12 de fevereiro de 1998. Diário Oficial da União – seção 1 de 13 de fevereiro de 1998.

BRASIL. **Portaria nº 3214**, Ministério do trabalho, 20 de dezembro de 1995.

BRASIL. **Portaria nº 2914**. Ministério da saúde. Brasília, 12 de dezembro de 2011.

BRASIL. **Resolução CONAMA nº 357**. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Brasília, 17 de março de 2005.

BRASIL. **Resolução CONAMA nº 396**. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Brasília, 03 de agosto de 2008.

BRASIL. **Resolução CONAMA nº 420**. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Brasília, 28 de dezembro de 2009.

BRASIL. **Resolução CONAMA nº 430**. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Brasília, 16 de maio de 2011.

BRASKEM - Ficha de segurança FISPQ nº: 1108 (2008) Xilenos, [on line] acesso em: 12 de junho de 2012.

BROOKE, L. **Report of the Flow-Through and Static Acute Test Comparisons with Fathead Minnows and Acute Tests with an Amphipod and a Cladoceran**. Center for Lake Superior Environmental Study, University of Wisconsin-Superior, Superior, WI :24, 1987.

BUCCAFUSCO, R. J.; ELLS, S. J.; LEBLANC. G. A. Acute toxicity of priority pollutants to bluegill (*Lepomis macrochirus*). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 26, p. 446-452, 1981.

BUKEMA, A. L, JR.; SHERBERGER, S.R. **Daphnia**. Carolina Tips Vol. XL n. 10, ISSN 0045-5865. 1977.

BURATINI, S. V.; BRANDELLI, A. Análise Estatística. Cap. 10, p. 221 - 249. In: **Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações**. ZAGATTO, P. A. & BERTOLETTI (org.), E. São Carlos: RiMa, p. 55-88. 2008.

CAJARAVILLE, M. P.; BEBIANNO, M. J.; BLASCO, J.; PORTE, C.; SARASQUETE, C.; A. The use biomarkers to asses the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Península: a practical approach. **Science Total Environmenal**, v. 247, p. 295 -311. 2000.

CALLEJA, M. C.; PERSOONE, G.; GELADI, P. Comparative acute toxicity of the first 50 multicentre evaluation of in vitro cytotoxicity chemicals to aquatic non-vertebrates. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. v. 26(1), p. 69-78. 1994.

CANADÁ, CCME. Canadian Council of Ministers of Environment, **Canadian Environmental Quality Guidelines**. 1995.

CANADÁ, CCMTR. Canadian Council of Ministers of the Environment. **Canadian Environmental Quality Guidelines**. PN1299. Winnipeg, MN. 1999.

CANTON, J.H.; ADEMA, D.M.M. Reproducibility of short-term and reproduction toxicity experiments with *Daphnia magna* and comparison of the sensitivity of *Daphnia magna* with *Daphnia pulex* and *Daphnia cucullata* in short-term experiments. **Hydrobiologia**, v. 59(2), p.135-140, 1978.

CESTEB, Companhia de Saneamento do Estado de São Paulo, 2001. **Relatório de estabelecimento de valores orientadores para solos e águas subterrâneas no Estado de São Paulo**, 2001.

CETESB, Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, 2004. **Norma técnica L5. 227 - Teste de toxicidade com a bactéria luminescente *Vibrio fischeri***: método de ensaio, São Paulo, 2004.

CESTEB, Companhia de Saneamento do Estado de São Paulo, 2005. **Lista de valores orientadores e de referência N. 195/2005**. 2005.

CHOI, D. H., HORI, K.;TANJI, Y.; UNNO, H. Microbial degradação kinetics of solid alkane dissolved in nondegradable oil phase. **Biochemical Engineering Journal**, v. 3, p. 71-78. 1999.

CORREA, M.; GARCIA, H. I. Physiological responses of juvenile white mullet, *Mugil curema*, exposed to benzene. **Bulletin Environmental Contaminant Toxicology**, v. 44(2), p.428-434,1990.

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** [online], v.31, n.7, p. 1820-1830, 2008.

COSTAN, G., BERMINGHAM, N.; BLAISE, G.; FERARD, J. E. Potential ecotoxic effects probe (PEEP): a novel index to assess and compare the toxic potential of industrial effluents. **Environmental Toxicology and Water Quality: an International Journal**, v.8, p. 115-140, 1993.

CURITIBA, **Decreto 1190**, Lei Municipal do Estado do Paraná, Secretaria do Meio Ambiente de Curitiba, 14 de dezembro de 2004.

DANGE, A. D.; MASUREKAR, V. B. Acute toxicity of petroleum hydrocarbons to the estuarine fish *Therapon jarbua* (Forsskal) and the estuarine clam *Katelysia opima* (Gmelin). **Proceedings of Symposium on Coastal Aquaculture**, 3:828-832. 1984.

DEVLIN, E. W., BRAMMER, J. D., PUYEAR, R. L. Acute toxicity of toluene to three age groups of fathead minnows (*Pimephales promelas*). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.29, p.12-17, 1982.

DEVLIN, E. W. **Developmental Studies on the Fathead Minnow (*Pimephales promelas* Raf.)** 183f. I. The Prehatching Development of the Fathead Minnow. II. The Acute Effects. [Ph.D. Thesis]. Fargo, ND: North Dakota State University, 1983.

DIN, DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG. DIN: 38412 (33). **Bio-assays (group L)**. Determining the tolerance of green algae to the toxicity of waste water (*Scenedesmus* chlorophyll fluorescence test) by way of a dilution series (L33). 1991.

DONAIRE, P. P. R. **Tratamento de água subterrânea contaminada com BTEX utilizando fotocatalise heterogênea**. 93f. Tese (Doutorado em Química) - Programa de Pós-Graduação em Química. Campinas, São Paulo, 2007.

EATMOND, D.A., G.M. BOOTH, M.L. LEE. Toxicity, accumulation, and elimination of polycyclic aromatic sulfur heterocycles in *Daphnia magna*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. v.13, p.105-111, 1984.

EGUCHI, K., N, H., OZAWA, M., E, Y.S., GOTO, K., HIRATA, K., M, K., Y, H. Evaluation of antimicrobial agents for veterinary use in the ecotoxicity test using microalgae. **Chemosphere**, v.57, p. 1733–1738, 2004.

EMFAL, Emfal Especialidades químicas. **Ficha de informações sobre segurança xileno**. FISPQ N. 217, 2007. [online] acesso em: 13 de julho de 2012.

ENVIRONMENT CANADA. **Guidance Document on Control of Toxicity Test Precision Using Reference Toxicants**. EPS 1/RM/12. 1990b.

ERBEN, R.; PISL, Z. Acute toxicity for some evaporating aromatic hydrocarbons for freshwater snails and crustaceans. **International e Revue der Gesamten Hydrobiologie**. v.78(1), p.161-167, 1993.

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, VI-007, 10p., 2001.

FERREIRA, D. G. **Biorremediação de Solo Argiloso Contaminado com Gasolina Aditivada com Diferentes Teores de Etanol**. 113f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia dos Processos Químicos e Bioquímicos) - Programa de Pós-graduação em Tecnologia dos Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

FISHBEIN. L. An overview of environmental and toxicological aspects of aromatic hydrocarbons II. **Toluene Science of The Total Environment**. v.42, p.267-288, 1985

FREAR, D. E. H.; BOYD, J. E. Use of *Daphnia* for the microbioassay of pesticides. I. Development of standardized techniques for rearing *Daphnia* and preparation of dosage mortality curves for pesticides. **Journal of Economic Entomology**. v.2, p.101-109, 1967.

FREITAS, J. G. ; MOCANU, M. T.; ZOBY, J. L. Z.; MOLSON, J. W.; BARKER, J. F. Migration and fate of ethanol-enhanced gasoline in groundwater: A modelling analysis of a field experiment. **Journal of Contaminant Hydrology**, v.119 (1-4), p. 25-43, 2011a.

FREITAS, J. G.; DOULATYARI, B.; MOLSON, J. W.; BARKER, J. F. Oxygenated gasoline release in the unsaturated zone, Part 2: Down gradient transport of ethanol and hydrocarbons. **Journal of Contaminant Hydrology**, v.125(1-4), p. 70-85, 2011b.

FURRAY, V.J.; SMITH, S. Toxicity and QSAR of chlorobenzenes in two species of benthic flat fish, flounder (*Platichthys flesus L.*) and sole (*Solea solea L.*). **Bull. Environmental Contaminant Toxicology**, v. 54, p.36-42, 1995.

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

GAMO, M.; OKA, T.; NAKANISHI, J. Ranking the risk of 12 major environmental pollutants that occur in Japan. **Chemosphere**, v.53, p. 277-284, 2003.

GEIGER, D. L.; BROOKE, L. T.; CALL, D. J. **Acute Toxicities of Organic Chemicals to Fathead Minnows**, Vol. 5 Center for Lake Superior Environmental Studies, University of Wisconsin, Superior, WI: 332 p. 1990.

GEIGER, D. L.; POIRIER, S. H.; BROOKE, L. T.; CALL, D. J. **Acute Toxicities of Organic Chemicals to Fathead Minnows (*Pimephales promelas*)**, Vol. 3. Center for Lake Superior Environmental Study., Univ. of Wisconsin-Superior, WI I: 328, 1986.

GHAZALY, K.S. Physiological alterations in *Claria lazera* induced by two different pollutants. **Water Air Soil Pollut.** v.60, p. 181-187, 1991.

GIBSON, D. T. **Microbial degradation of organic compounds**. Macmillan Publishing (Edit.), 292p. 1984.

GILMAN. A. G; GOODMAN, L.S. RALL, T. W. **The Pharmacological Basis of Therapeutics**, 7th ed., Macmillan Publishing (Edit.), New York, New York, 1985.

GIROTTI, S.; FERRI, E.N.; FUMO, M.G.; MAIOLINI, E. Monitoring of environmental pollutants by bioluminescent bacteria. **Analytica Chimica Acta**, v. 608, p. 2-29, 2008.

GODOI, A. F. L.; GODOI, R. H.; AZEVEDO, R.; MARANHO, L. T. Poluição e a densidade de vegetação: BTEX em algumas áreas públicas de Curitiba - PR, Brasil. **Química Nova**, v.33, n.4, p.827-833, 2010.

GOSSETT, R.W.; BROWN, D.A.; YOUNG, D.R. Predicting the bioaccumulation of organic compounds in marine organisms using octanol/water partition coefficients. **Marine Pollutant Bulletin**, v. 24, p.387-92, 1983.

GRAHAM, L. E.; GRAHAM, J. M.; WILCON, L. W.; CUMMINGS. B. **Algae**. 2<sup>a</sup> ed. Pearson. 2009.

GREENE, J. C.; MILLER, W. E.; DEBACON, M.; LONG, M. A.; BARTELS, C. L. Use of *Selenastrum capricornutum* to assess the toxicity potential of surface and ground water contamination caused by chromium waste. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.7, p.35-39, 1988.

GREGUS, Z.; KLAASSEN, C. **Mechanisms of Toxicity**. New York. McGraw-Hill, Cap. 3 - p.35-81, 2001.

GROUDEVA, V.I.; GROUDEV, S.N.; DOYCHEVA, A.S. Bioremediation of waters contaminated with crude oil and toxic heavy metals. **International Journal Mineralogy Process**, v.62, p.293-299, 2001.

GSCHWEND, P. M.; MACFARLANE, J. K. Polybromomethanes: A yearround study of their release to seawater from two furoid algae: *Ascophyllum nodosum* and *Fucus vesiculosus*, p. 3 14-322. In: **Organic marine geochemistry. ACS Symposium Series**, September, 1986.

GUIMARÃES, E. S.; LACAVAL, P. M.; MAGALHÃES, N. P. Avaliação da toxicidade aguda com *Daphnia Similis* na água captada no Rio Paraíba do Sul e processada na Estação de Tratamento de água do município de Jacareí-SP – Brasil. **Revista de Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 9 (2), Abr/Jun, 2004.

HALLING-SØRENSEN, B., HOLTEN-LÜTZHØFT, H.C., ANDERSEN, H.R., INGERSLEV, F., Environmental risk assessment of antibiotics: comparison of mecillinam, trimethoprim and ciprofloxacin. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.46 (Suppl. S1); p. 53– 58, 2000.

HALUCH, S. M; KAWALL, H. G. Comparativo entre a utilização de *Daphnia magna* Straus, 1820 (Cladocera, Crustacea) e *Daphnia similis* Claus, 1876 (Cladocera, Crustacea) em testes ecotoxicológicos em laboratório. Monografia de Conclusão de Curso. Universidade Tuiuti do Paraná. 2010.

HAMILTON, A.; HARDY H. L. **Industrial Toxicology**. 3rd ed. Acton, Mass: Publishing Sciences Group, Inc. 1974.

HAMILTON, M.A., R.C. RUSSO, R.V. THURSTON. "Trimmed Spearman-Kärber Method for Estimating Median Lethal Concentrations in Toxicity Bioassays," **Environ. Sci. Technol.**, 11(7), pp. 714-719). 1977.

HEADLEYL, J. V.; GOUDEY, S.; BIRKHOLZ, D.; LINTONA, L. R. ;. DICKSONS, L.C. Toxicity Screening of Benzene, Toluene, Ethylbenzene and Xylene (BTEX) Hydrocarbons in Groundwater at Sour-Gas Plants. **Canadian Water Resources Journal**. v.26, n.3, 2001.

HEGEWALD, E., SCHMIDT, A.; SCHNEPF, E. Revision der lateral bestachelten *Desmodesmus*-Arten, 1: *Desmodesmus subspicatus* (R. Chodat) E. Hegewald & A. Schmidt. **Algological Studies**, v. 101, p. 1-26, 2000.

HELENO, F. F.; LIMA, A. C.; AFONSO, R. J. C. F.; COUTRIM, M. X. Otimização e validação de métodos analíticos para determinação de BTEX em água utilizando extração por headspace e microextração em fase sólida. **Química Nova** [online], v.33 (2), p. 329-336, 2010.

HELLAWELL, J. M. **Biological Indicators of Freshwater Pollution and Environmental Management**, (Pollution Monitoring Series), p. 509, Ed. Elsevier Applied Science Publishers, London and New York. 1986.

HENDERSON, R. F. Strategies for use of biological markers of exposure. **Toxicology Letter**, v. 82-83, p.379, 379, 1995.

HERMAN, D. C.; INNIS, W. E.; MAYFIELD, C.I. Impact of volatile aromatic hydrocarbons, alone and in combination, on growth of the freshwater alga *Selenastrum capricornutum*. **Aquatic Toxicology**, v.18, p.87-100, 1990.

HERNANDO, M. D.; MALATO, O.; FARRÉ, M.; FERNANDEZ-ALBA, M.; BARCELÓ, D. Application of ring study: Water toxicity determinations by bioluminescence assay with *Vibrio fischeri*, **Talanta**. v. 69, p.370-376, 2006.

HODGE, H.C.; STERNER, J. H. Tabulation of toxicity classes. **American Industry Hygues Quarty.**, v. 10, p. 94-97. 1944.

HUTCHINSON, T. H.; SHILLABEER, N.; WINTER, M. J.; PICKFORD, D. B.. Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. **Aquatic Toxicology**, v.76(1), p. 69-92, 2006.

INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia Qualidade e Tecnologia, Brasil: **FISPQ: Ficha de segurança solução de referência certificado de BTEX**, versão 2, revisão 25/04/2012 [online] acesso: 10 de junho de 2012.

INNOVA, Innova Soluções tecnológicas. **Ficha de Informação de segurança de produto químico Etilbenzeno** IN0002\_P versão 0,2P de 24/04/2006; [online], acesso: 12 de julho de 2012.

ISO, INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO: 8692** - Water Quality: Fresh Water algal growth inhibition teste with *Desmodesmus subspicatus* and *Selenastrum capricornutum*. ISO, Geneva, Switzerland. 1989.

ISO, INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO: 6341** – Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) – Acute toxicity test. 1996.

ISO, INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO: 5661(16)**. Water Quality: sampling: guidance on biotesting of sample. 1998.

ISO, INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO: 11348-1**. Waterquality - Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminiscent bacteria test). 2007.

IRIS, U.S. Environmental Protection Agency. Benzene. **Integrated Risk Information System**. Disponível em: <http://www.epa.gov/iris/subst/0276.htm> [on line] acesso: 10 de novembro 2012. 2001.

KESSELER, E., M. SCHAFFER, C. HUMMER, A. KLOBOUCEK, and V.A.R. HUSS, Physiological, biochemical, and molecular characters for the taxonomy of the subgenera of *Scenedesmus* (Chlorococcales, Chlorophyta). **Botanica Acta**, v. 110, p.244 – 250, 1997.

KNIE, J. L. W.; LOPES, E. W. B. **Testes Ecotoxicológicos: Métodos, técnicas e aplicações**. Florianópolis-SC: FATMA/ GTZ. 2004.

KRAMÁROVÁ Z, FARGASOVÁ, MOLNÁROVÁ M, BUJDOS M. Arsenic and selenium interactive effect on alga *Desmodesmus quadricauda* - **Ecotoxicol Environ Safety**, v.86, p.1-6, 2012.

KULKAMP, M. S.; CORSEUIL, H. X.; AMORIM, JR., C. Influência do etanol na biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo em um aquífero contaminado com uma mistura de diesel etanol. In: XII **Congresso Brasileiro de Águas Subterrâneas**, p.1-11. 2002.

KURITZ, T.; WOLK, C. P. Genome analysis of *Clostridium botulinum* TypeA by pulsed-field gel electrophoresis. **Applied Environmental Microbiology**. v.61, p.234-241, 1995.

LEBLANC, G. A. C Acute toxicity of priority pollutants to water flea (*Daphnia magna*). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. v.24, p. 684-691, 1980.

LEWIS, M.A. Are laboratory-derived toxicity data for fresh-water algae worth effort? **Environmental Toxicology and Chemistry**. v.9 (2), p 1279 – 1284, 1990.

LISTA HOLANDESA – **Lista 6530 de valores de águas e solos** – Legislação Internacional para solos e águas subterrâneas – Padrão Internacional. Versão novembro de 1999. Anexos 1,2,3 e 4.[online]. Acesso: 12 de junho de 2012.

LITICHFIELD Jr, J.T; WILCOXON, F. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 96, p.99 -113, 1949.

MACLEAN, M. M.; DOE, K.G. **The Comparative Toxicity of Crude and Refined Oils to *Daphnia magna* and *Artemia***. Environment Canada, EE-111, Dartmouth, Nova Scotia. 212p. 1989.

MANUAL DE OPERAÇÃO CG 7890, ION TRAP Agilent Tech. 2012. – Instruções de uso do cromatógrafo CG MS/MS – TECLAB.

MANUAL DE OPERAÇÃO HP 5890, Série II, 2009 – Instruções de uso do cromatógrafo gasoso com detetor FID – TECLAB.

MANUAL DE OPERAÇÃO Lumistox Dr. Lange<sup>R</sup>, 2009. Instruções de uso do lumistox e lumisoft – TECLAB.

MARCHINI, S., M.D. HOGLUND, S.J. BORDERIUS; M.L. TOSATO. Comparison of the Susceptibility of Daphnids and Fish to Benzene Derivatives. **Sci.Total Environ.** (Suppl.), v.134(1), p.799-808. 1993.

MARCHINI, S., M.L. TOSATO, T.J. NORBERG-KING, D.E. HAMMERMEISTER; M.D. HOGLUND. Lethal and sublethal toxicity of benzene derivatives to the fathead minnow using a shortterm test. **Environ. Toxicol. Chem.** v.11, p.187-195, 1992.

MASSACHUSETTS, **Sediment Toxicity of Petroleum Hydrocarbon Fractions - Massachusetts Department of Environmental Protection** - Office of Research and Standards Winter Street 8th Floor Boston, MA 02108 BATTELLE 397 Washington Street Duxbury, MA 02332. September. 2007.

MAYER, JR. F. L.; ELLERSIECK. M. R. **Manual of Acute Toxicity: Interpretation and Data Base for 410 Chemicals and 66 Species of Freshwater Animals.** Resour.Publ.No.160, U.S.Dep.Interior, Fish Wildl.Serv., Washington, DC. 1986.

MAYER, P.; OLDERSMA H.; HANSTVEIT, A. O. **Determination of the effect of benzene on the growth of the freshwater green alga *Selenastrum capricornutum*.** TNO Report 00-2360/01TNO. Nutrition and Food Research. Delft, The Netherlands, 2001.

MCKEE, RICHARD H. JOHN H. BUTALA, RAYMOND M. DAVID, GERHARD GANS. NTP center for the evaluation of risks to human reproduction reports on phthalates: addressing the data gaps (Review). **Reproductive Toxicology**, v. 18, p.1-22, 2004.

MEDINSKY, M. A., L, T. L., CSANAGY, G. A., GARGAS, M. L., and BOND, J. A. In vivo metabolism of butadiene by mice and rats: a comparison of physiological model predictions and experimental data. **Carcinogenesis**, v. 15, p.1329–1340, 1994.

MEEK, M. E.; CHAN, E. K. L. Bis(2ethylhexyl)phthalate: Evaluation of risks to health from environmental exposure in Canada. **Journal of Environmental Science and Health, Part C: Environmental Carcinogenesis and Ecotoxicology Reviews**, v. 12(2), p. 179-187,1994.

MERCK. **Catálogo oficial de substâncias químicas – reagentes químicos**, 2005 a 2007.

MEYERHOFF, R.D. Acute toxicity of benzene, a component of crude oil, to juvenile striped bass (*Morone saxatilis*). **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**, v. 32, p.1864-1866, 1975.

MIDZENSKI, M. A.; McDIARMID, M. A.; ROTHMAN, N.; KOLODNER, K. Acute high dose exposure to benzene in shipyard workers. **American Journal of Industrial Medicine**, v. 22, p.553-565,1992.

MOLES, A., RICE, S. D.; KORN, S. Sensitivity of Alaskan freshwater and anadromous fishes to Prudhoe Bay crude oil and benzene. **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 198, p.498-414, 1979.

MORROW J. E., GRITZ, R. L., KIRTON, M. P. Effects of some components of crude oil on young coho salmon. **Copeia**, v.4, p. 320-331. 1975.

MURRAY, F. J.; JOHN, J. A.; RAMPY, L. W. Embryotoxicity of inhaled benzene in mice and rabbits. **American Industrial Hygiene Association Journal**, v. 40, p.933-998, 1979.

NAGPAL, N. K. Science and Information Branch - Ambient Aquatic Life Guidelines for Toluene. Overview Report, First Update - Section 5 of the Environmental Management. Water Stewardship Division. **Library and Archives Canada**. 2007.

NEFF, J. M. **Bioacumulação em organismos marinhos**. Editora: Elsevier Science. 460 p. 2002.

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

NIPPER, M. Curso sobre "Avaliação de toxicidade de efluentes" In: **ABES e FUNDESPA** em julho de 2000, São Paulo. 2002.

NIT DICLA-057. Critérios para acreditação da amostragem de águas e matrizes ambientais. Disponível em: [www.inmetro.gov.br](http://www.inmetro.gov.br). Acesso: 20 junho de 2012.

NUNES-HALLDORSON, V. S.; DURAN, N.L. Bioluminescent bacteria: Lux genes as environmental biosensors. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.34, p.91-96, 2003.

OSWALDO CRUZ, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratórios químicos, **FISPQ: Ficha de segurança de benzeno** [online] acesso: 20 de julho de 2012.

OKUMURA, Y., KOYAMA, J., TAKAKU, H., SATOH, H. Influence of organic solvents on the growth of marine microalgae. **Archives of Environmental Contaminat Toxicology**, v. 41, p.123–128, 2001.

OECD. **Guidelines for the testing of chemicals**. Fish Acute Toxicity Tests. (OECD, 1981) .

PARANÁ, **Portaria nº 19**. Secretaria de Estado do Meio Ambiente e Recursos Hídricos. Diário Oficial do Estado, 10 de fevereiro de 2006. Curitiba. 2006.

PARANÁ, **Resolução nº 70**. Conselho Estadual do Meio Ambiente. Diário Oficial do Estado, 01 de outubro. 2009.

PARANÁ, **Resolução CEMA nº 81** - Conselho Estadual do Meio Ambiente, Valores de referência para descarte de efluentes. 2010.

PARANÁ, **Resolução SEMA nº 21** - Conselho Estadual do Meio Ambiente, Valores de referência para solo, água e para descarte de efluentes. 2011.

PARVEZ, S.; VENKATARAMAN, C.; MUKHERJI, S. A review on advantages of implementing luminescence inhibition test (*Vibrio fischeri*) for acute toxicity prediction of chemicals. **Environment International**, v. 32, p.265-268, 2006.

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

PENNER, G. C. **Estudos Laboratoriais da Contaminação do Solo por Gasolina com o Uso de Detector de Fotoionização**. 2000, 109f. Dissertação (Mestrado). Programa de pós-graduação em Engenharia. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos – SP., 2000.

PERSONNE, E., L, B., HERRMANN, B., MATTSON, M., SCHJOERRING, J.K., NEMITZ, E., SUTTON, M.A., C., P.: A model combining the surface energy balance and bi-directional exchanges of ammonia applied at the field scale, **Biogeosciences**, v.6, p.1371-1388, 2009.

PETALA, M. et al. Evaluation of Toxic Response of Heavy Metals and Organic Pollutants using Microtox®Acute Toxicity test. 9th. **International Conference on Environmental Science And Technology**. v. 65(1-3), p.1200-1205, 2005.

PETROBRAS. FISPQ: **Ficha de segurança do tolueno**. BR600 [online], acesso:20 de julho de 2012. 2011<sup>a</sup>.

PETROBRAS. FISPQ: **Ficha de segurança do xileno**. BR612 [online], acesso:20 de julho de 2012. 2011<sup>b</sup>.

PETROBRAS. FISPQ: **Ficha de segurança Etilbenzeno**, FISPQ: IN0002 [online], acesso: 20 de julho de 2011<sup>c</sup>.

PETROVILA, Petrovila Química Ltda. FISPQ: **Ficha de segurança do xileno** FISPQ nº 016, [online], acesso:20 de julho de 2011.

RADIX, P.: LÉONARD,M.; PAPANTONIOU, C.; ROMAN, G.; SAOUTER, E.; GALLOTTI-SCHMITT, S. THIÉBAUD, H. VASSEUR, P. Comparison of Brachionus calyciflorus 2-D and MICROTOX chronic 22-h tests with Daphnia magna 21-D test for the chronic toxicity assessment of chemicals. **Environmental Toxicology Chemistry**, v.18 (10), p.2178 -2185, 1999.

RAND, G. M. **Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, environmental fate and risk assessment**. Second Edition. Taylor & Francis, Washington, DC. 1125 p. 1995.

RAND, G. M.; PETROCELLI,S. R. **Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications**. Hemisphere(Ed.), New York, 65 p.,1985

RAO, K.S.; KHAN, A. K S.M.; ALAM,R. NAGABHUSHANAM. Seasonal toxicity of benzene to the marine edible crab Scylla serrata. **Environmental Ecology**, v.6(1), p. 220-221, 1988.

RATTE, H. T., HAMMERS M., WIRTZ C., CLEUVERS, R. Ecotoxicity testing. Chapter 7.p.221-274. In B.A. Markert, A.M. Breure, H.G. Zechmeister (eds.) **Bioindicators and biomonitors**, 9 ed. Elsevier Science. New York, 2003.

REGO, M. A. Reflexões sobre o Câncer Ocupacional. **Sociedade Bahiana de Medicina do Trabalho**. 1999.

REN, S.; FRYMIER, P. D. Use of multidimensional scaling in the selection of wastewater toxicity test battery components. **Water Research**, v.37, n.37, p. 1655-1661, 2003.

RIO GRANDE DO SUL. Conselho Estadual do Meio Ambiente (CONSEMA). **Resolução Estadual nº 129**, de 24 de novembro de 2006, Porto Alegre, 2006.

RIZZO, L. Bioassays as a tool for evaluating advanced oxidation processes in water and wastewater treatment, **Water Research**, v. 45, n. 15, p. 4311 – 4340, 2011.

ROBERTO, R.E. e ABREU, R.M. Utilidade dos indicadores de qualidade de águas. **Ambiente**, São Paulo, v.5, n.1, p 47 -51, 1991.

ROBINSON, A.A., BELDEN, J.B., Lydy, M.J. Toxicity of fluoroquinolone antibiotics to aquatic organisms. **Environmental Toxicology Chemistry**. v.24, p.423–430, 2005.

RODRIGUES, M. T. P. **XILOL: Efeitos Imunológicos e Hematológicos a exposição ocupacional em histotécnicos**.84f. 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde). Programa de pós-graduação em Ciências Ambientais e Saúde. Goiânia – Goiás, 2005.

RUPERT, E. E, BARNES, R.D. **Zoologia dos Invertebrados**, 6º edição, São Paulo: Roca. 1996.

SAHA, M.K.; S.K. KONAR. Acute toxicity of some petroleum pollutants to plankton and fish. **Environmental Ecology**. 1:117-119. 1983.

SANTA CATARINA. **Portaria nº 17**. Fundação do Meio Ambiente (FATMA). Diário Oficial do Estado, 18 de abril de 2002.

SANTOS, L. H. M. L. M., ARAÚJO, A. N., FACHINI, A., PENA, A., DELERUEMATOS, C.; MONTENEGRO, M. C. B. S. M. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. **Journal of Hazardous Materials**, v.175, n. 1-3, p. 45 – 95, 2010.

SANTOS, R. M. S.; SANTOS, M. F. Quimiluminescência e Bioluminescência. **Química Nova**, v. 16, p. 200-210, 1993.

SANTA CATARINA. Lei nº 14.675. Estado de Santa Catarina. **Diário Oficial do Estado**, 13 de abril de 2009.

SANTA CATARINA. Portaria nº 17. Fundação do Meio Ambiente (FATMA). **Diário Oficial do Estado**, 18 de abril de 2002.

SÃO PAULO. Secretaria do Meio Ambiente **Decreto nº 8.468**, de 31 de maio de 1976. São Paulo. 1976.

SÃO PAULO. Secretaria do Meio Ambiente. **Resolução SMA nº 3**, de 22 de fevereiro de 2000. São Paulo, 2000.

SCHAMBECK, C. M. **Cinética de biodegradação de múltiplos substratos em águas subterrâneas impactadas por derramamentos de misturas de gasolina com etanol**. 122f. 2012. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental). Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2012.

SCHNEIDER, M., R. **Intemperismo de fontes de contaminação em aquíferos impactados por derramamentos de gasolina e álcool e a influência sobre o risco à saúde humana**. 178f. 2005. Tese (Doutorado). Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2005.

SICKO-GOAD. L.; STOERMER, E.F. In: Toxic contaminants and ecosystem health: A great lakes focus. **Advances in environmental science and technology**. v.21. p. 19 – 52, 1988.

SILVA. F. L. N.; SANTOS JR., J. R.; MOITA NETO, J. M.; SILVA, R. L. G. N.; FLUMIGNAN, D. L.; OLIVEIRA, J. E. Determinação de benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos em gasolina comercializada nos postos do estado do Piauí. **Química Nova** [online], v.32 (1), p. 56-60, 2009.

SILVA, R. L. B.; BARRA, C. M.; MONTEIRO, T. C. N.; BRILHANTE, O. M. Estudo da contaminação de poços rasos por combustíveis orgânicos e possíveis conseqüências para a saúde pública no Município de Itaguaí, Rio de Janeiro, Brasil. **Caderno de Saúde Pública** [online]., v.18, n.6, p. 1599-1607, 2002.

SLOOFF, W. Detection limits of a biological monitoring system based on fish respiration. Bull. **Environmental Contaminants Toxicology**, v. 23(4-5), p.517-523, 1979.

SLOOFF, W. A. **Comparative Study on the Short-Term Effects of 15 Chemicals on Fresh Water Organisms of Different Tropic Levels**. Natl.Tech. Inf. Serv. Springfield, VA: 25 p. 1982.

SLOOFF, W., J.H. CANTON; J.L.M. HERMENS. Comparison of the susceptibility of 22 freshwater species to 15 chemical compounds. I. (Sub) Acute Toxicity Tests. **Aquatic Toxicology**, v. 4(2), p.113-128, 1983.

SOSAK-SWIDERSKA, B.; TYRAWKA, D.; MASLIKOWSKA, B. Microalgal ecotoxicity test with 3, 4 dichloroaniline. **Chemosphere**, v.37, p.2975 – 2982. 1998.

SOVEREIGN BRASIL. FISPQ: **Xileno**. Ficha Número 00037 Versão 2.0 [online], acessado em julho de 2012. 2009.

SPACIE, A.; HAMELINK J.L. Bioaccumulation. In: **Fundamental of Aquatic Toxicology: Methods and Application**, Cap.8, p. 495-525 (eds. Rand, G.M. and Petrocelli, S.R.) Hemisphere, 1985.

SPACIE, A.; McCARTY, L.S., RAND, G.M. Bioaccumulation and bioavailability in multiphase systems. In: **Fundamentals of aquatic toxicology – Effects, Environmental Fate and Risk Assessment**. (eds. Gary M. Rand Ed. Taylor; Francis, 2. Ed. 1995.

STEINBERGER, S.; POZIOMEK, E.; ENGELMANN, W.; ROGERS, K. A Review of Environmental Applications of Bioluminescence Measurements. **Chemosphere**, v. 30, n. 11, p.2155-2197, 1995.

STEPHAN, C.E. Methods for calculating an LC50. Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation ASTM STP 634. F.L. Mayer and J.L. Hamelink – **American Society for testing and Materials**, 65-84. 1977.

STRAUS, Daphnidae, Sistema de taxionomia,1820. In: **Tree of Life**. Disponível em: <http://tolweb.org/tree/>. Acesso: 11 fevereiro de 2011.

TATARAZAKO, N., Y. TAKAO, K. KISCHI, N. ONIKURA, K. ARIZONO; T. IGUCHI. Styrene dimers and trimers affect reproduction of daphnid (*Ceriodaphnia dubia*). **Chemosphere**. v. 48(6). p.597-601, 2002.

TAVARES, J. K. **Remoção de compostos BTEX de soluções aquosas por adsorção**. 2007. 104f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. Florianópolis – Santa Catarina, 2007.

TIBURTIUS, E. R. L.; PERALTA-ZAMORA, P.; LEAL, E. S. Contaminação de águas por BTEXs e processos utilizados na remediação de sítios contaminados. **Química Nova** [online]. v.27 (3), p. 441-446, 2004.

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

TRAINOR F.R., CAIN J.R.; SHUBERT E.L. Morphology and nutrition of the colonial green alga *Scenedesmus*. **Botanical Review**. v. 42, p.5-25, 1976.

TRIGUEIRO , D.E.G. **Avaliação da cinética de biodegradação dos compostos tóxicos: benzeno, tolueno, etilbenzeno, xileno (BTEX) e fenol**. 157f. 2008. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Campus de Toledo), Toledo – Paraná, 2008.

TRUCCO, R. G.; ENGELHARDT, F.R.; STACEY, B. Toxicity, accumulation and clearance of aromatic hydrocarbons in *Daphnia pulex*. **Environmental Pollution series A- Ecological and Biological**. v.31 (3), p. 191-202, 1983.

TRUHAUT, R. Ecotoxicology: objectives, principles and perspectives. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 1, p. 151-173, 1977.

TRUJILLO, F.; DANG, D.; STARK, T. Xylene Keratopathy: A Case Report and Review of the literature. **Cornea**, v. 22 (1), p. 88-90, 2003.

TSUJI, S.; TONOGAI, Y.; ITO, Y.; KANO, S. The Influence of rearing temperatures on the toxicity of various environmental pollutants for killifish (*Oryzias latipes*). **Journal Biological Chemistry**. v.4, p.123-129, 1986.

UMBUZEIRO, G. A.; HACHICH, E. M.; MAGRI, E. V. F.; TAKEDA, S. H. K.; SATO, M. I. Z. Influência da Sacarose e do Cloreto de Sódio na Avaliação da Toxicidade de Amostras Ambientais para *V. fischeri* (Short Communication), **Journal of Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 5, n. 1, p.71-73, 2010.

US ARMY. Engineer Waterways Experiment Station. **Environmental Effects of Dredging** – Technical Notes: Factors Influencing Bioaccumulation of sediments-associated Contaminants by Aquatic Organisms. 9p. 1989.

US EPA - Environmental Protection Agency. In: **Depth Studies on Health and Environmental Impacts of Selected Water Pollutants**. Contract No. 68-01-4646, U.S. EPA. Duluth, MN. 1978.

US EPA - Environmental Protection Agency. **Final Draft for Drinking Water Criteria Document on Benzene**. Office of Drinking Water, Washington, DC. PB86-118122, 1985.

US EPA - Environmental Protection Agency. **Guidelines for the health: risk assessment of chemical mixtures**, 1986.

U.S. Environmental Protection Agency. **EPA 3890** – Metodologia de ensaio para análise e BTEX por Headspace, 1987.

US EPA - Environmental Protection Agency. **Short-term methods for measuring the chronic toxicity of effluents and receivingwaters to freshwater organisms**. 2º ed. Cincinnati, OH.: EPA 600/4- 89/001, 1989.

US EPA - Environmental Protection Agency. **EPA/600/8-90/066F**. Methods for derivation of inhalation reference concentrations and application of inhalation dosimetry, dated October. 1994.

US EPA - Environmental Protection Agency. **Extrapolation of the Benzene Inhalation Unit Risk Estimate to the Oral Route of Exposure**. National Center for Environmental Assessment, Office of Research and Development, Washington, DC. NCEA-W-0517. 1999.

US EPA - Environmental Protection Agency. **EPA 821 – B-00-004**. Method guidance and recommendations for whole effluents toxicity (WET) testing (40 CFR Part 136), 2000.

US EPA - Environmental Protection Agency. **EPA-821-R-02-012**. Short-term methods for estimating the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. 5<sup>th</sup> Ed. U.S. Environmental Protection Agency. Office of Water, Washington, DC. 2002.

US EPA - Environmental Protection Agency.. **EP-306**. High Production Volume Chemical Challenge Program, HPV Robust Summaries and Test Plan. September, 2009.

US EPA - Environmental Protection Agency, **BTEX**. BTEX is the term used for benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene-volatile aromatic compounds typically found in petroleum product, such as gasoline and diesel fuel. 2010.

VAN HANNEN, E. J.; FINK, P.; LÜRLING, L. A revised secondary structure model for the internal transcribed spacer 2 of the green algae *Scenedesmus* and *Desmodesmus* and its implication for the phylogeny of these algae. **European Journal of Phycology**. v. 37, p. 203-208, 2002.

VERSTEEG, D. J.; STALMANST, M.; DYER, S. D.; JANSSEN, C. *Ceriodaphnia* and *Daphnia*: a comparison of their sensitivity to xenobiotics and utility as a test species. **Chemosphere**, v.34(4), p/869-892, 1997.

VIDOTTI; E. C. E ROLLEMBERG, M. C. Algas: da economia nos ambientes aquáticos a biorremediação e a química analítica. **Química Nova**. v. 27 (1), p. 139-145, 2004.

VIEIRA, F. C. S. **Toxicidade de Hidrocarbonetos Monoaromáticos do Petróleo sobre *Metamysidopsis elongata atlantica* (Crustacea, Mysidacea)**. 2004. 72f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental. Universidade Federal de Santa Catarina - Florianópolis, SC, 2004.

WHITE, D. **The physiology and biochemistry of prokaryotes**. 2<sup>o</sup> ed. New York, Oxford. 2009.

WHO - World Health Organization, Internacional Programme on Chemical Safety – ICPS. Assessing human health risks of chemicals, Geneva. **Environmental Health Criteria**, n 170. 1994.

ZAGATTO, P.A. Validação de Testes de Toxicidade com Organismos Aquáticos. Cap. 11, p. 251 – 267. In: **Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações**. ZAGATTO, P. A. & BERTOLETTI, E. São Carlos: Rima, p. 55-88. 2008.

## ANEXO A

SOLUÇÕES TESTES DO CULTIVO DE *Daphnia magna*

Tabela A1 - Soluções do meio básico – M4

Solução	Reagente	Fórmula	Concentração por litro	mL.L <sup>-1</sup>
1	Cloreto de cálcio di-hidratado	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	73,5g	3,2
2	Sulfato de magnésio hepta-hidratado	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	123,3g	0,8
3	Cloreto de potássio	KCl	5,8g	0,8
4	Bicarbonato de sódio	NaHCO <sub>3</sub>	64,8g	0,8

Tabela A2 - Soluções estoque do meio de cultivo nutritivo

Solução	Reagente	Fórmula	Concentração por litro	(mL.L <sup>-1</sup> )
5	Cloreto de manganês tetra-hidratado	MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	7,21g	0,1
	Cloreto de lítio	LiCl	6,12g	
	Cloreto de rubídio	RbCl	1,42g	
	Cloreto de estrôncio hexa-hidratado	SrCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	3,04g	
	Cloreto de cobre di-hidratado	CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,335g	
6	Cloreto de Zinco	ZnCl <sub>2</sub>	0,26g	0,5
	Cloreto de Cobalto hexa-hidratado	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,20g	
	Nitrato de sódio	NaNO <sub>3</sub>	0,548g	
	Ácido bórico	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	5,719g	
	Brometo de sódio	NaBr	0,032g	
7	Molibdato de sódio di-hidratado	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,126g	0,5
	Metavanalato de amônio	NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>	0,00115g	
	Iodeto de potássio	KI	0,0065g	
	Selenito de sódio	NaSe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,00438g	
8	Silicato de sódio	Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub>	21,475g	0,2
8	Titriplex III	EDTA	0,500g	5,0
	Sulfato ferroso hepta-hidratado	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,199g	
9	Ortofosfato di-hidrogenado de potássio	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,286g	0,5
	Ortofosfato hidrogenado de dipotássio	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,368g	
10	Hidrocloreto de tiamina		0,750g	0,1 Desgongelar na hora
	Cianocobalamina (Vitamina B12)		0,0010g	
	D(+) Biotina		0,00075g	

Meio de cultivo = meio básico + meio M4

## ANEXO B1

### RESUMO BIOENSAIOS COM *Daphnia magna*.

Quadro B1 - Resumo dos bioensaios com *Daphnia magna*.

Requisitos	Espécie
Bioindicador	<i>Daphnia magna</i>
Tipo de ensaio	Estático: 48 horas
Idade do organismo-teste	2 horas , máximo 26 horas
Água de diluição	Água reconstituída
Numero mínimo de organismos por diluições	20
Numero mínimo de replicatas por diluição	Duas
Alimentação	Nenhuma
Temperatura	18°C a 22° C
Fotoperíodo	Escuro
Efeito observado	Imobilidade
Expressão dos resultados	CE50, FT ou tóxico e não tóxico Inibição a 10% em relação ao controle

## ANEXO C

### SOLUÇÕES TESTES PARA *VIBRIO FISCHERI*

**Tabelas C1 - Constituintes para o meio de cultivo líquido para *Vibrio fischeri***

Reagente	Fórmula	concentração por 1 litro de solução
Cloreto de sódio	NaCl	30g
Sulfato de magnésio heptahidratado	MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0,204g
Fosfato de potássio dibásico tri-hidratado	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . 3H <sub>2</sub> O	2,75g
Fosfato de sódio mono-hidratado	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	6,1 g
Di-Amôniohidrogenofosfato	[(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ]	0,5 g
Glicerol (glicerina líquida)	---	3 mL
Peptona Bacteriológica	---	5g
Extrato de Levedura	---	0,5g

**Tabelas C2 - Constituintes para solução crioprotetora**

Reagente	Fórmula	Concentração por 1 litro de solução
D(+) Glicose mono-hidratada	(C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> .H <sub>2</sub> O)	66g
Cloreto de Sódio	NaCl	4g
L-Histidina	---	2g
Soro Albumina bovina	---	0,5 g

**Tabela C3 - Solução para reconstituição de culturas frescas e desidratadas**

Reagente	Fórmula	Concentração por 1 litro de solução
D(+) Glicose mono-hidratada	(C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> . H <sub>2</sub> O)	8g
Cloreto de Sódio	NaCl	20g
Cloreto de magnésio hexa-hidratado	MgCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	2,035g
Cloreto de potássio	KCl	0,3g
HEPES	C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S	11,9g

## ANEXO D

MEIO DE CULTIVO CHU *Desmodemus subspicatus*Tabela D1 - Meio de cultivo (MEIO CHU) para *Desmodemus subspicatus*.

Solução	Reagente	Fórmula	Concentração por 1 litro de solução	Volume transferido (mL.L <sup>-1</sup> )
1	Nitrato de sódio	NaNO <sub>3</sub>	25 g	10
2	Cloreto de cálcio di-hidratado	CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	2,5 g	10
3	Sulfato de magnésio hepta-hidratado	MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	7,5 g	10
4	Fosfato de potássio dibásico	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7,5 g	10
5	Fosfato de potássio monobásico	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	17,5 g	10
6	Cloreto de sódio	NaCl	2,5 g	10
7	Titriplex III	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>8</sub> . 2H <sub>2</sub> O	31 g	1
	Hidróxido de potássio	KOH		
8	Sulfato ferroso hepta-hidratado	FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	4,98 g	1
9	Ácido bórico	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	11,42 g	1
10	Sulfato de zinco hepta-hidratado	ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	8,82 mg	1
	Cloreto de manganês tetra-hidratado	MnCl <sub>2</sub> . 4H <sub>2</sub> O	1,44 mg	
	Óxido de Molibdênio	MoO <sub>3</sub>	0,71 mg	
	Sulfato de cobre penta-hidratado	CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	1,57 mg	
	Nitrato de Cobalto hexa-hidratado	Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	0,49 mg	

Tabela D2 - Soluções estoque do meio nutriente

Solução I (Sais Nutrientes)		
Reagente	Fórmula	Concentração por litro
Cloreto de Amônia	NH <sub>4</sub> Cl	1,5 g
Cloreto de magnésio hexa-hidratado	MgCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	1,2 g
Cloreto de cálcio di-hidratado	CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	1,8 g
Sulfato de magnésio hepta-hidratado	MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	1,5 g
Fosfato de potássio monobásico	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,16 g
Solução II (Complexo Ferro)		
Cloreto férrico hexa-hidratado	FeCl <sub>3</sub> . 6H <sub>2</sub> O	80 mg
Titriplex III	Na <sub>2</sub> EDTA . 2H <sub>2</sub> O	100 mg
Solução III (Micronutrientes)		
Ácido bórico	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	185 mg
Cloreto de magnésio tetra-hidratado	MnCl <sub>2</sub> . 4H <sub>2</sub> O	415 mg
Cloreto de zinco	ZnCl <sub>2</sub>	3 mg
Cloreto de cobalto hexa-hidratado	CoCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	1,5 mg
Cloreto de cobre di-hidratado	CuCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0,01 mg
Molibdato de sódio di-hidratado	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	7,0 mg

## ANEXO E

### SOLUÇÃO NUTRIENTE E RESUMO DO TESTE DE *Desmodesmus subspicatus*

**Quadro E1 - Resumo dos testes com *Desmodesmus subspicatus*.**

Requisitos	Condições
Tipo de ensaio	Estático
Diluyente	Água processada ou meio de cultura
Inóculo	Em fase exponencial
Número de replicatas por diluição	Três
Temperatura	23 a 27° C
Iluminação	Maior que 4.500 lux
Velocidade de agitação	100 a 175 rpm
Tempo de exposição	96 h
Efeito observado	Inibição de crescimento da biomassa
Expressão dos resultados	FT, CENO, CEO, CI Inibição a 20% em relação ao controle

## ANEXO F

### RESUMO DOS TESTES COM *Vibrio fischeri*

Quadro F1 - Resumo dos testes com *Vibrio fischeri*

<b>Requisitos</b>	<b>Espécie</b>
Bioindicador	<i>Vibrio fischeri</i>
Tipo de ensaio	Estático: 30 minutos
Numero mínimo de replicatas por diluição	Duas
Temperatura	15° C
Efeito observado	Queda de emissão de luz
Expressão dos resultados	CE50, CE20, FT, tóxico e não tóxico Inibição a 20% em relação ao controle

## ANEXO G

## CEMA 70/2009 – PADRÕES PARA O LANÇAMENTO DE EFLUENTES

1) Beneficiamento de mandioca	
- processos com segregação de efluentes (água de lavagem, água vegetal e outros concentrados)	
- águas de lavagem de mandioca	
- processos sem segregação de efluentes	
Toxicidade aguda:	FT <sub>D</sub> para <i>Daphnia magna</i> : 8 (12,5%) FT <sub>bi</sub> para <i>Vibrio fischeri</i> : 8 (12,5%)
2) Sucroalcooleira	
Toxicidade aguda:	FT <sub>D</sub> para <i>Daphnia magna</i> : 8 (12,5%) FT <sub>bi</sub> para <i>Vibrio fischeri</i> : 8 (12,5%)
3) Laticínio	
Toxicidade aguda:	FT <sub>D</sub> para <i>Daphnia magna</i> : 8 (12,5%) FT <sub>bi</sub> para <i>Vibrio fischeri</i> : 8 (12,5%)
4) Curtume	
Toxicidade aguda:	FT <sub>D</sub> para <i>Daphnia magna</i> : 8 (12,5%) FT <sub>bi</sub> para <i>Vibrio fischeri</i> : 8 (12,5%)
Toxicidade crônica:	FT para <i>Desmodesmus subspicatus</i> : 8 (12,5%)
5) Frigorífico	
Toxicidade aguda:	FT <sub>D</sub> para <i>Daphnia magna</i> : 8 (12,5%) FT <sub>bi</sub> para <i>Vibrio fischeri</i> : 8 (12,5%)
6) Tintura, Têxteis e lavanderia industrial	
Toxicidade aguda:	FT <sub>D</sub> para <i>Daphnia magna</i> : 8 (12,5%) FT <sub>bi</sub> para <i>Vibrio fischeri</i> : 8 (12,5%)
7) Extração e refino de óleo de soja	
Toxicidade aguda:	FT <sub>D</sub> para <i>Daphnia magna</i> : 8 (12,5%) FT <sub>bi</sub> para <i>Vibrio fischeri</i> : 8 (12,5%)
8) Bebidas	
Toxicidade aguda:	FT <sub>D</sub> para <i>Daphnia magna</i> : 8 (12,5%) FT <sub>bi</sub> para <i>Vibrio fischeri</i> : 8 (12,5%)
9) Maltearia	
Toxicidade aguda:	FT <sub>D</sub> para <i>Daphnia magna</i> : 8 (12,5%) FT <sub>bi</sub> para <i>Vibrio fischeri</i> : 8 (12,5%)
10) Tratamento de superfície	
Toxicidade aguda:	FT <sub>D</sub> para <i>Daphnia magna</i> : 16 (6,25%) FT <sub>bi</sub> para <i>Vibrio fischeri</i> : 8 (12,5%)
11) Indústrias químicas	
Toxicidade aguda:	FT <sub>D</sub> para <i>Daphnia magna</i> : 8 (12,5%) FT <sub>bi</sub> para <i>Vibrio fischeri</i> : 8 (12,5%)
Toxicidade crônica:	FT para <i>Desmodesmus subspicatus</i> : 8 (12,5%)
12) Papel e celulose	
Toxicidade aguda:	FT <sub>D</sub> para <i>Daphnia magna</i> : 8 (12,5%) FT <sub>bi</sub> para <i>Vibrio fischeri</i> : 8 (12,5%)
Toxicidade crônica:	FT para <i>Desmodesmus subspicatus</i> : 8 (12,5%)
13) outras atividades	
Toxicidade aguda:	FT <sub>D</sub> para <i>Daphnia magna</i> : 8 (12,5%) FT <sub>bi</sub> para <i>Vibrio fischeri</i> : 8 (12,5%)

## ANEXO G

(continuação)

### G2 - CEMA 81/2010 – Tipologias de efluentes e avaliação ecotoxicológicas

art. 3 § 1º limites máximos de toxicidade exigidos para o lançamento de efluentes em corpos hídricos	FT = 8
§ 2º Para efluentes do tipo galvânico o limite máximo de ecotoxicidade para <i>Daphnia magna</i>	FT = 16
§ 3º Para efluentes do tipo galvânico o limite máximo de ecotoxicidade para <i>Vibrio fischeri</i>	FT = 8
Art. 4 § 1º a partir do quarto ano da publicação desta resolução o limite máximo de toxicidade : FT = 4	
§ 2º a partir do Oitavo ano da publicação desta resolução o limite máximo de toxicidade : FT = 2	

**ANEXO H****INCERTEZAS DE DETERMINAÇÃO BTEX**

Quadro H1 – Incertezas de medição do ensaio de BTEX.

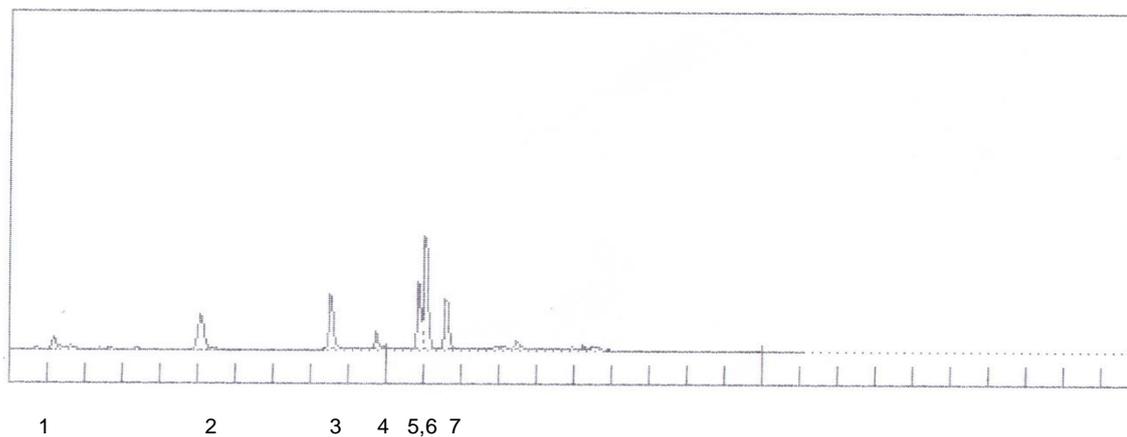
Ensaio	Incerteza de medição Expandida 95%	K (fator de abrangência)
BENZENO	±0,74%	2
TOLUENO	±0,92%	2
ETILBENZENO	±0,98%	2,13
<i>m,p</i> XILENOS	±0,88%	2
<i>o</i> XILENO	±6,5%	3,31

## APÊNDICE A

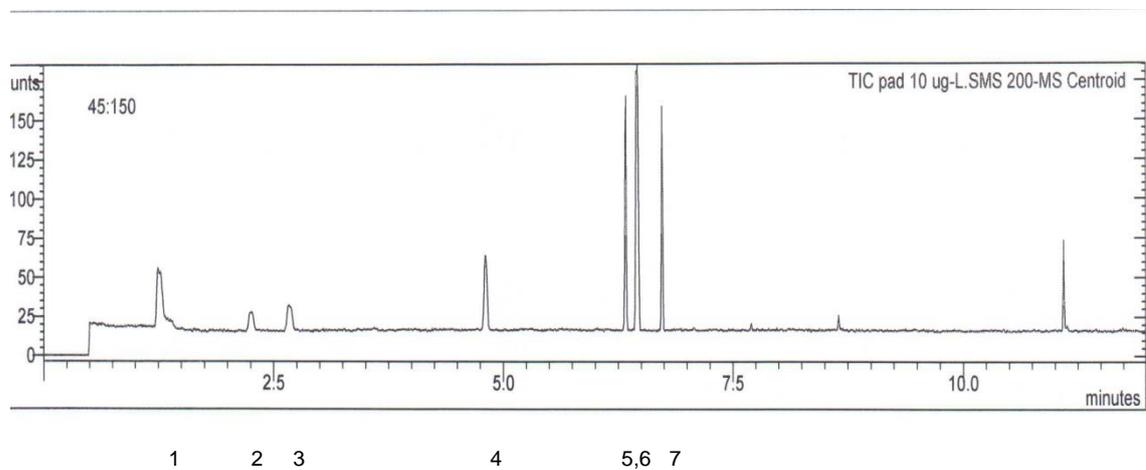
### CROMATOGRAMAS

Cromatograma CG-FID

10 µg.L<sup>-1</sup>



Cromatograma CG MS/MS

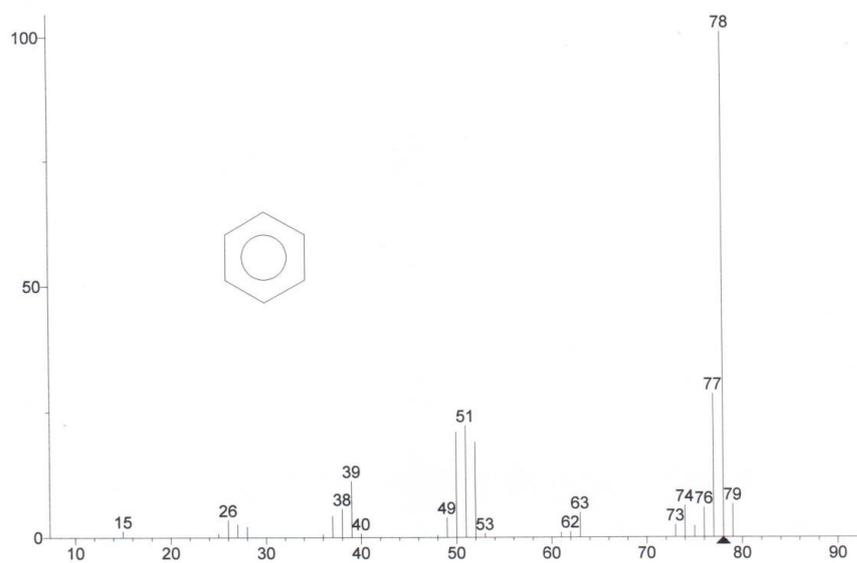


- 1 – metanol
- 2 – benzeno
- 3 – etilbenzeno
- 4 – tolueno
- 5,6 – m, p xilenos
- 7 – o xileno

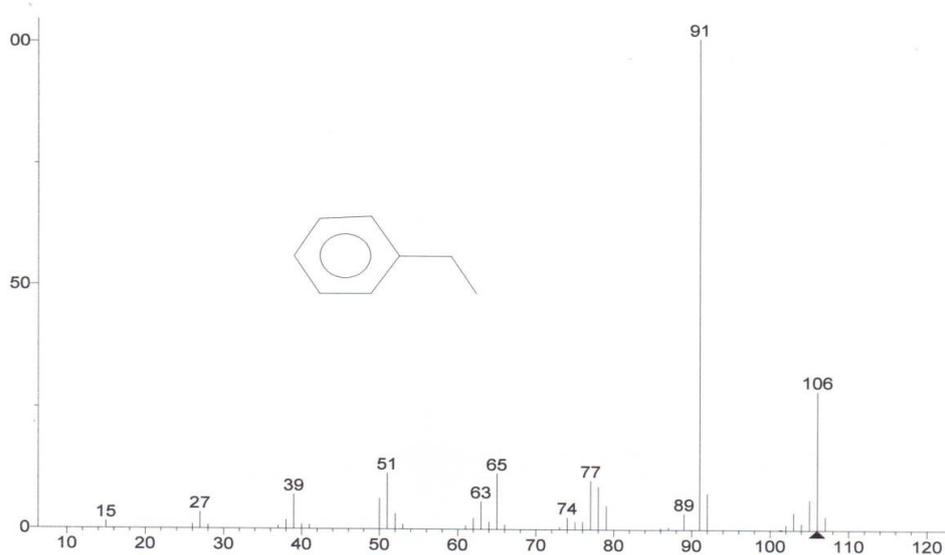
## APÊNDICE B

## ESPECTROS DE MASSA

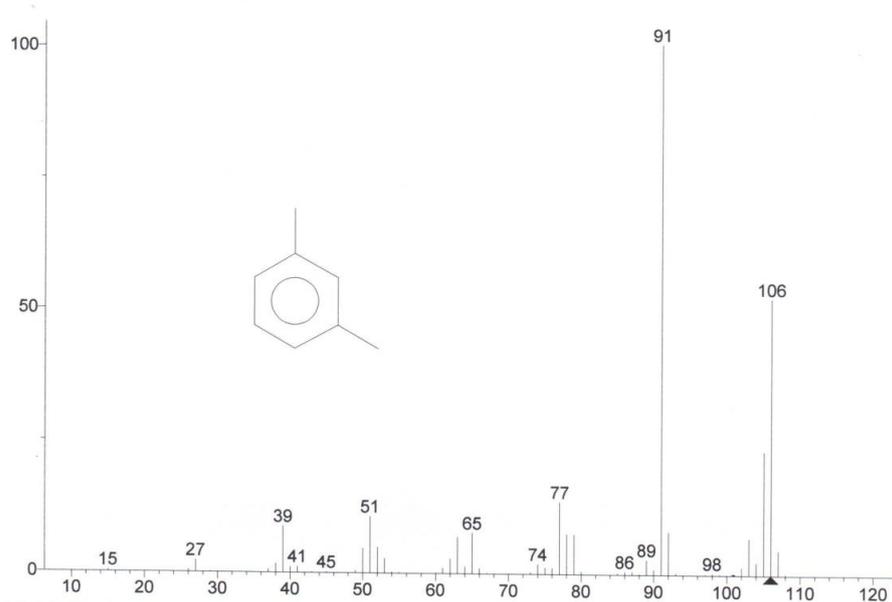
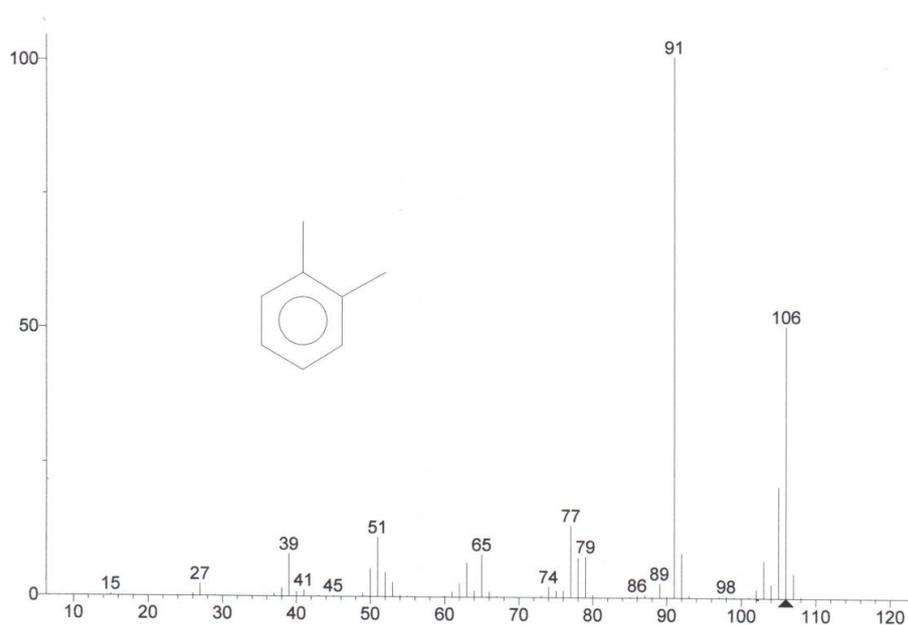
## B1 - Espectro benzeno



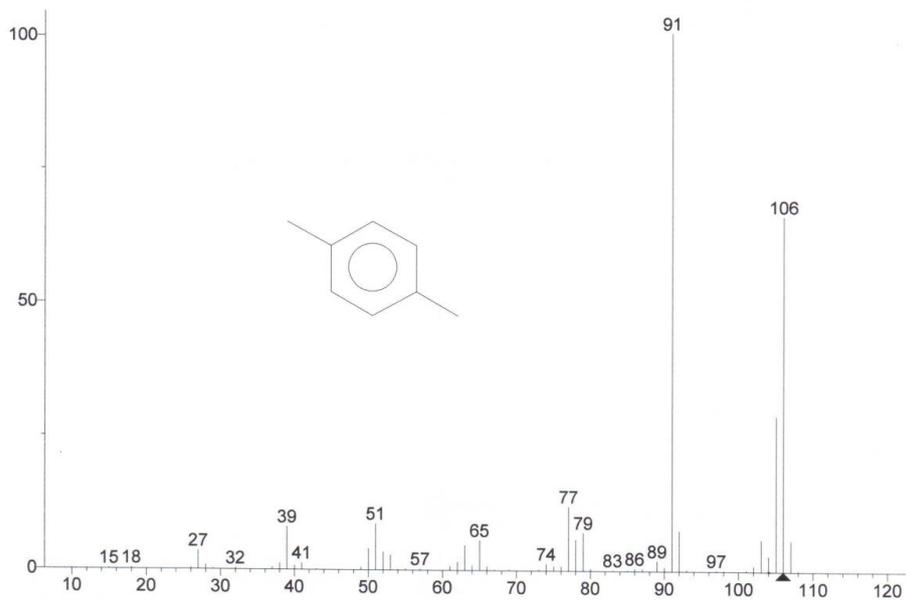
## B2 - Etilbenzeno



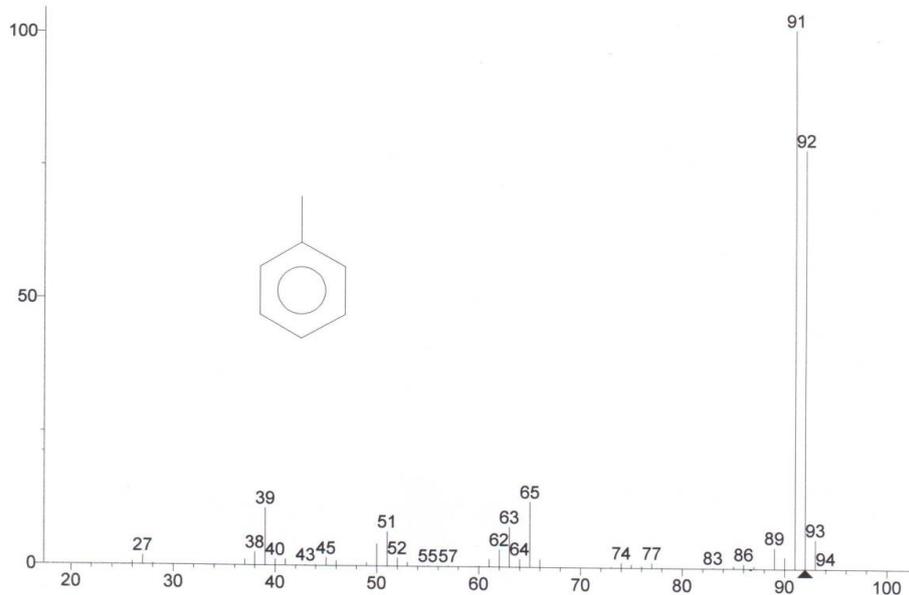
## APÊNDICE B2

B3 - *m*-xilenoB4 - *o*-xileno

## APÊNDICE B3

B5 - *m* - xileno

## B6-Tolueno



## APÊNDICE C

### DADOS DOS ENSAIOS COM BTEX

Dados obtidos do ensaio com BTEX do controle “branco do bioensaio” e dos testes realizados com as soluções de BTEX utilizando as cepas 1 e 2.

BRANCO Controle negativo	LEITURA INICIAL Clorofila ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	LEITURA FINAL Clorofila ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	LEITURA INICIAL Clorofila ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	LEITURA FINAL Clorofila ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )
	CEPA 1		CEPA 2	
	0,177	6,741	0,298	5,998
	0,108	6,601	0,387	6,012
	0,116	6,599	0,314	6,099

Testes $\mu\text{g.L}^{-1}$	CEPA 1			CEPA 2		
	INICIAL Clorofila ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	FINAL Clorofila ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	% inibição Média das leituras	INICIAL Clorofila ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	FINAL Clorofila ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	% inibição Média das leituras
10	0,158	6,801	0	0,204	6,287	0
	0,149	6,814		0,277	6,211	
	0,121	6,996		0,211	6,309	
50	0,188	6,799	0	0,255	6,433	0
	0,196	6,856		0,286	6,207	
	0,103	6,924		0,213	6,119	
70	0,136	6,799	0	0,298	6,292	0
	0,147	6,863		0,301	6,302	
	0,201	6,866		0,302	6,388	
100	0,183	6,891	0	0,289	6,298	0
	0,177	6,941		0,292	6,107	
	0,199	6,992		0,286	6,287	
200	0,157	6,974	0	0,211	6,301	0
	0,159	6,944		0,256	6,354	
	0,231	7,001		0,276	6,187	
400	0,163	6,977	0	0,234	6,399	0
	0,125	6,998		0,277	6,108	
	0,169	6,891		0,286	6,191	
1000	0,149	6,863	0	0,287	6,297	0
	0,147	6,877		0,209	6,287	
	0,112	7,033		0,215	6,289	

# APÊNDICE D1

## INFORMAÇÕES ADICIONAIS DO WORKSTATION

### Etilbenzeno

#### Compound Information

Peak Name: Ethylbenzene  
 Result Index: 3      Compound Number: 3      CAS Number: 100-41-4      Identified

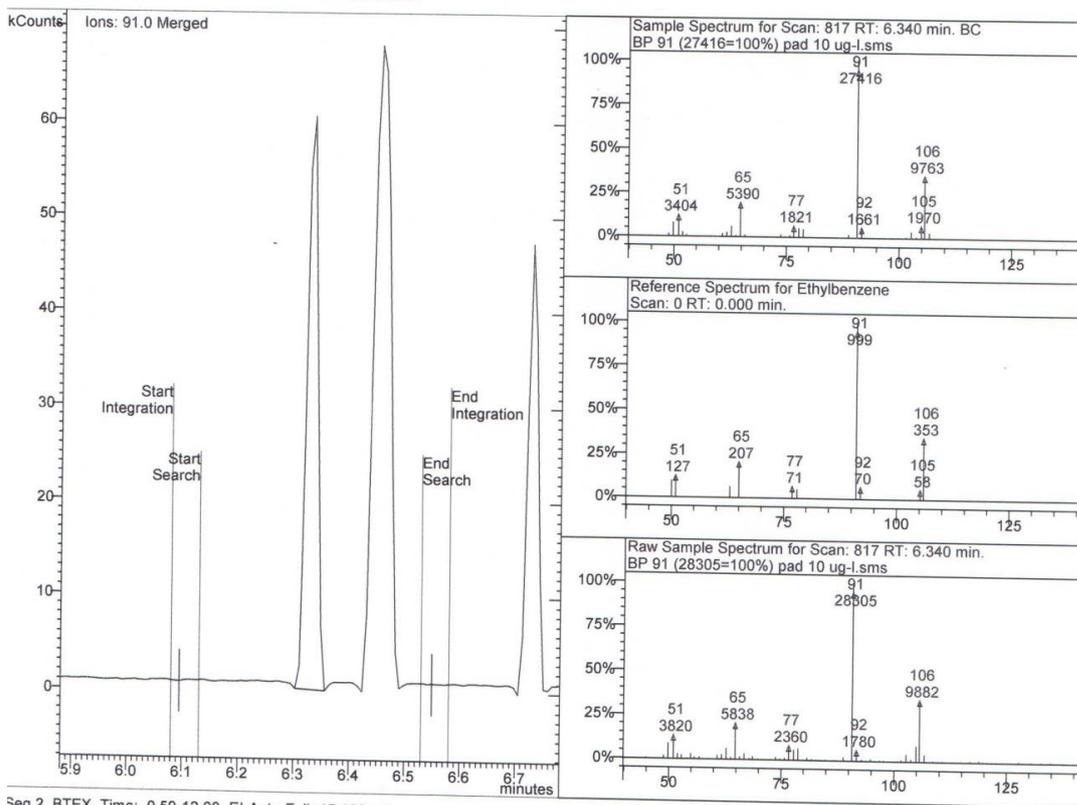
#### Identification

Parameter	Specification	Actual	Status
Search Type	Spectrum		
Retention Time	6.330 +/- 0.200	6.330 min.	Pass
Match Result	N-R >= 500	999	Pass

#### Integration and Quantitation

Parameter	Specification	Actual	Status
Quan Ions	91.0		
Calibration Equation	Linear, Force, None	$y = +8291.0820x$	
Area	>=100	84228	Pass
Height		60418	
Amount (RF)		8422.8	

Match Types: N-R : Normal-Reverse



## APÊNDICE D2

### INFORMAÇÕES ADICIONAIS DO WORKSTATION

#### Benzeno

##### Compound Information

Peak Name: Benzene  
 Result Index: 1  
 Compound Number: 1  
 CAS Number: 71-43-2  
 Identified

##### Identification

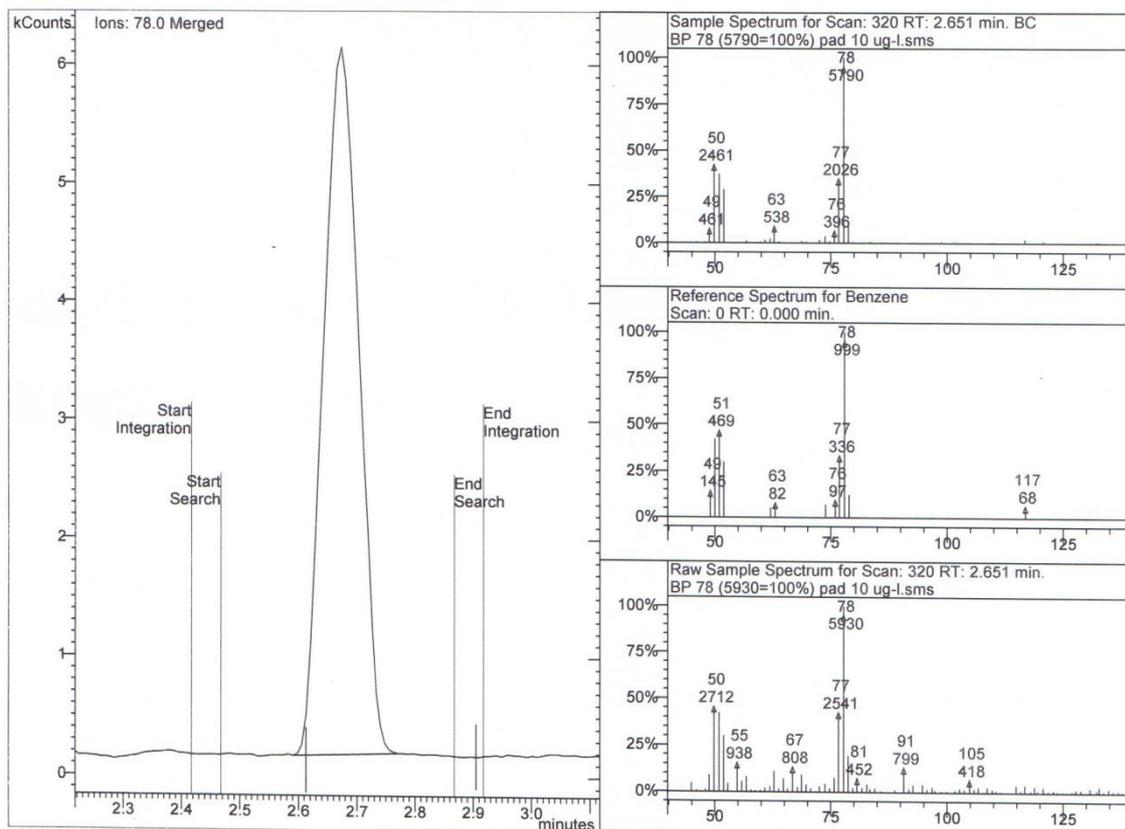
Parameter	Specification	Actual	Status
Search Type	Spectrum		
Retention Time	2.667 +/- 0.200	2.673 min.	Pass
Match Result	N-R >= 700	934	Pass

##### Integration and Quantitation

Parameter	Specification	Actual	Status
Quan Ions	78.0		
Calibration Equation	Linear, Force, None	$y = +2463.3416x$	
Area	>=100	25269	Pass
Height		5967	
Amount (RF)		2526.9	

Match Types:

N-R : Normal-Reverse



Seg 2, BTEX, Time: 0.50-12.00, EI-Auto-Full, 45-150 m/z

# APÊNDICE D3

## INFORMAÇÕES ADICIONAIS DO WORKSTATION

### Tolueno

#### Compound Information

Peak Name: Toluene  
 Result Index: 2      Compound Number: 2      CAS Number: 108-88-3      Identified

#### Identification

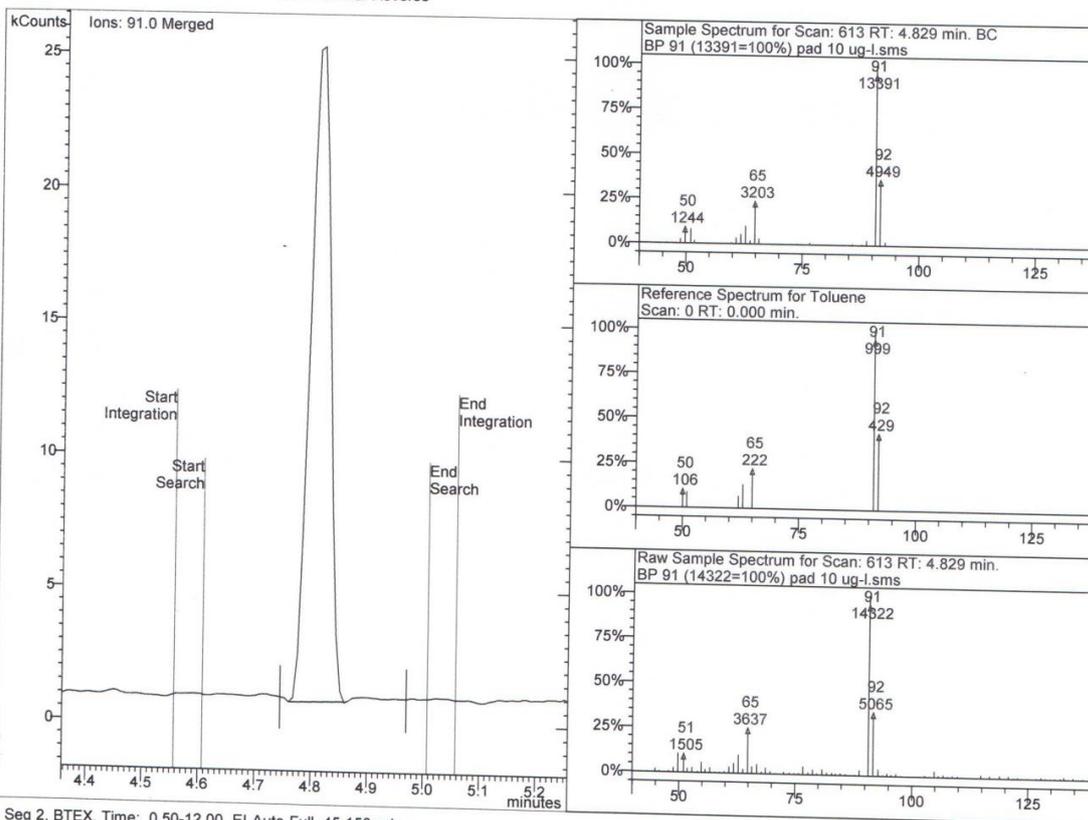
Parameter	Specification	Actual	Status
Search Type	Spectrum		
Retention Time	4.807 +/- 0.200	4.810 min.	Pass
Match Result	N-R >= 700	997	Pass

#### Integration and Quantitation

Parameter	Specification	Actual	Status
Quan Ions	91.0		
Calibration Equation	Linear, Force, None	$y = +6072.0044x$	
Area	>=500	61703	Pass
Height		24544	
Amount (RF)		6170.3	

Match Types:

N-R : Normal-Reverse



Seg 2, BTEX, Time: 0.50-12.00, EI-Auto-Full, 45-150 m/z

## APÊNDICE D4

### INFORMAÇÕES ADICIONAIS DO WORKSTATION

#### o Xileno

##### Compound Information

Peak Name: o-Xylene  
 Result Index: 5      Compound Number: 5      CAS Number: 95-47-6      Identified

##### Identification

Parameter	Specification	Actual	Status
Search Type	Spectrum		
Retention Time	6.730 +/- 0.200	6.729 min.	Pass
Match Result	N-R >= 700	791	Pass

##### Integration and Quantitation

Parameter	Specification	Actual	Status
Quan Ions	91.0		
Calibration Equation	Linear, Force, None	$y = +5981.6333x$	
Area	>=100	61277	Pass
Height		47148	
Amount (RF)		6127.7	

Match Types:

N-R : Normal-Reverse

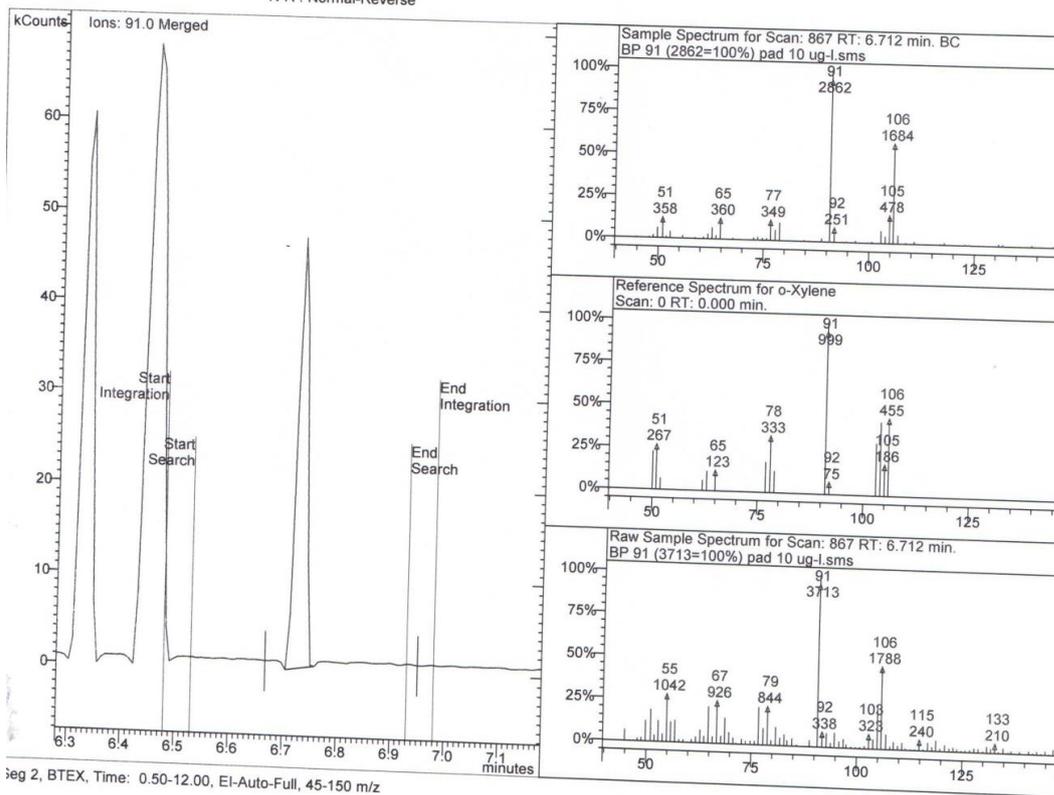


Fig 2, BTEX, Time: 0.50-12.00, EI-Auto-Full, 45-150 m/z

## APÊNDICE D5

### INFORMAÇÕES ADICIONAIS DO WORKSTATION

m,p xilenos

#### Compound Information

Peak Name: m+p-Xylene  
 Result Index: 4      Compound Number: 4      CAS Number: 106-42-3      Identified

#### Identification

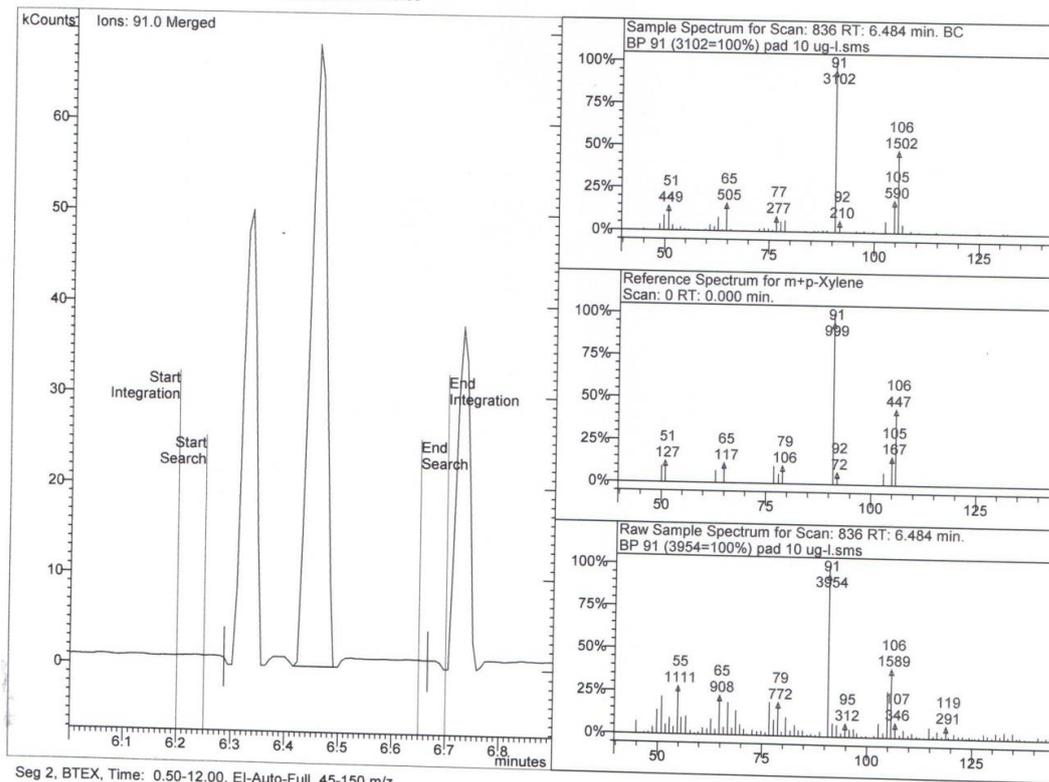
Parameter	Specification	Actual	Status
Search Type	Spectrum		
Retention Time	6.450 +/- 0.200	6.456 min.	Pass
Match Result	N-R >= 700	995	Pass

#### Integration and Quantitation

Parameter	Specification	Actual	Status
Quan Ions	91.0		
Calibration Equation	Linear, Force, None	$y = +7155.5815x$	
Area	>=100	144838	
Height		68552	Pass
Amount (RF)		7241.9	

Match Types:

N-R : Normal-Reverse



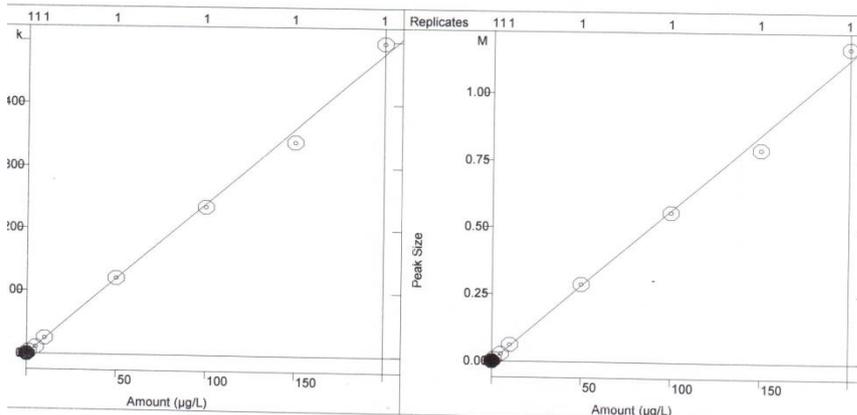
Seg 2, BTEX, Time: 0.50-12.00, EI-Auto-Full, 45-150 m/z

## APÊNDICE E

### CURVAS CROMATOGRAFIA CG MS/MS

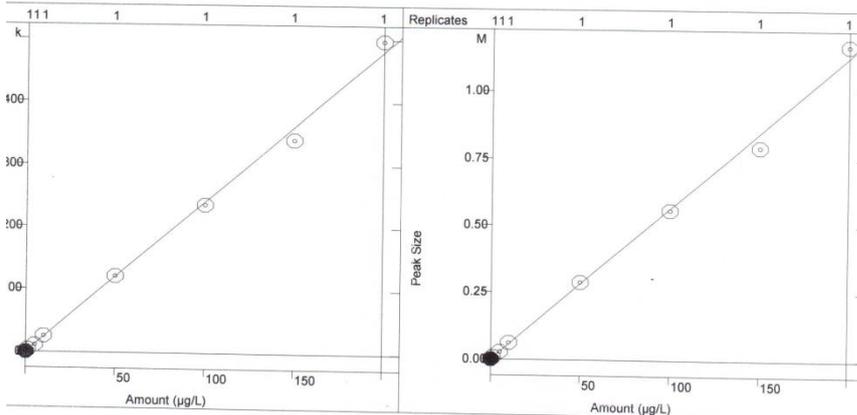
Benzeno

Coef. ( $R^2$ )=0,997011



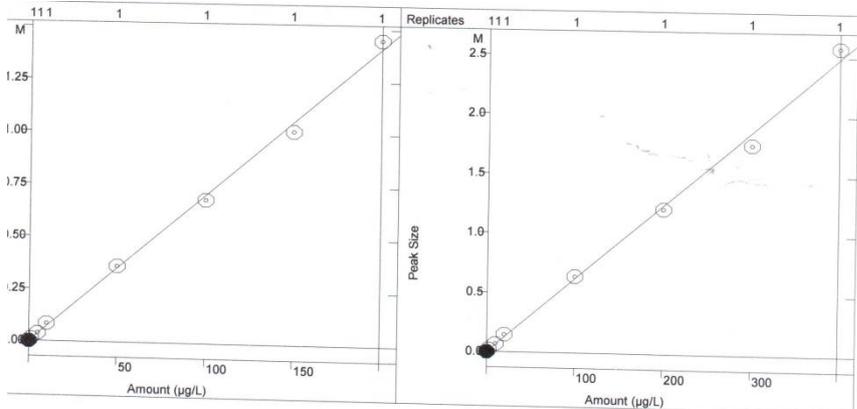
tolueno

Coef. ( $R^2$ )=0,996494



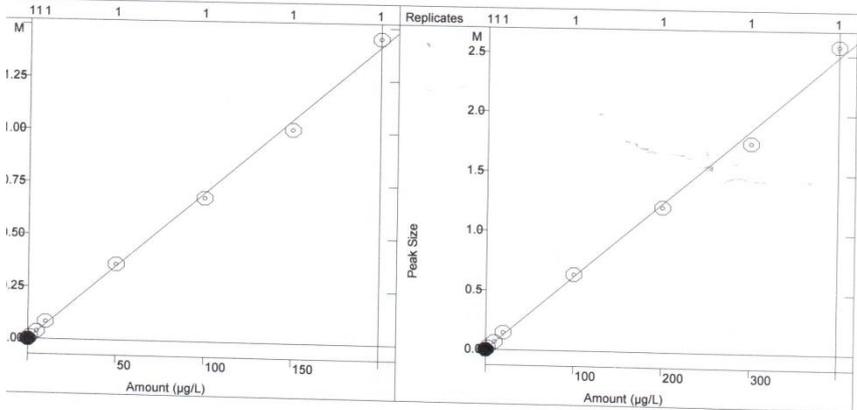
Etilbenzeno

Coef. ( $R^2$ )=0,997888

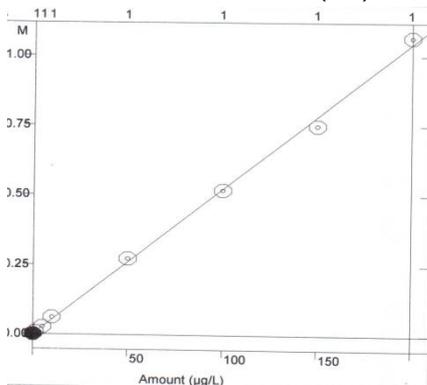


*m,p* xilenos

Coef. ( $R^2$ )=0,996738



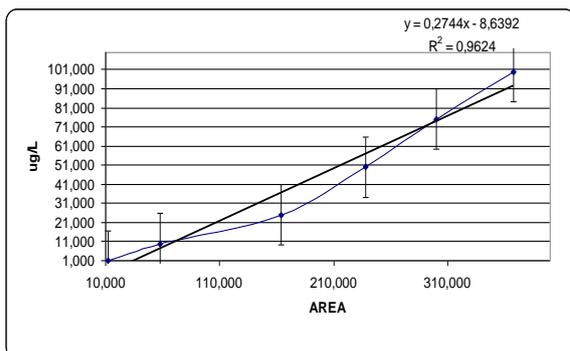
*o*-xileno - Coef. ( $R^2$ )=0,998397



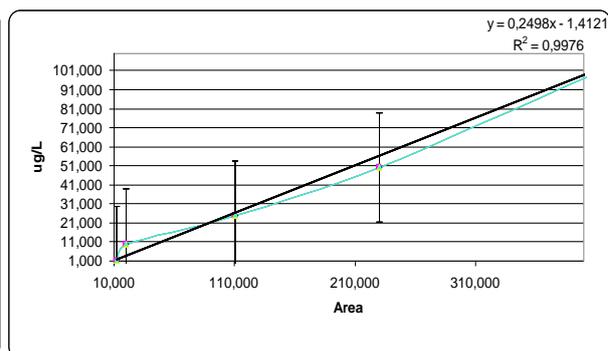
## APÊNDICE F

### CURVAS CROMATOGRAFIA CG FID

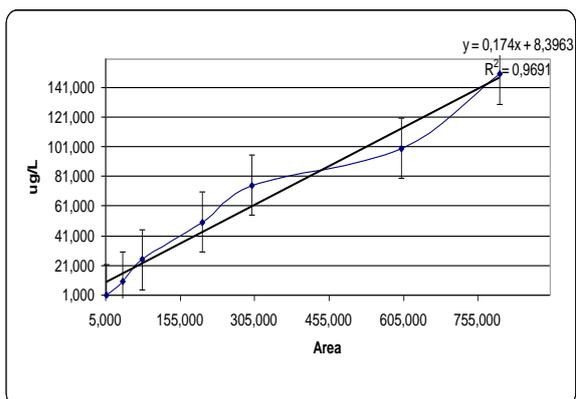
Benzeno



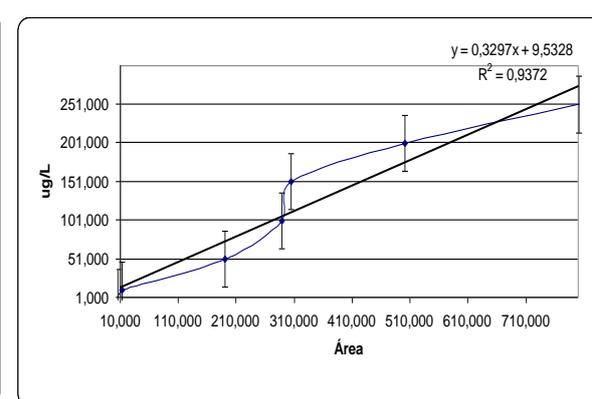
Tolueno



Etilbenzeno



*m,p* xilenos



*o*-xileno

